

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Thématique 524 : Biologie, Santé, « Bio-santé »

Faculté des Sciences et techniques

Laboratoire UMR CNRS 6101

« Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et Lymphoprolifération »

Thèse n°30-2010

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie

présentée et soutenue publiquement par

Christelle VINCENT-FABERT

Le 27 septembre 2010

ETUDE DU RÔLE DE LA REGION REGULATRICE 3'RR DU LOCUS IgH DANS LA LYMPHOPOÏESE B ET LA LYMPHOMAGENESE B PAR DES MODELES *IN VIVO*

Directeur de thèse : Yves Denizot

Jury :

Président : **Marie-Odile Jauberteau** – Professeur, Université de Limoges
Rapporteurs : **Pierre Dubus** – Professeur, Université de Bordeaux
François Rougeon – Directeur de Recherche, Université de Paris
Examineurs : **Estelle Duprez** – Chargé de Recherche CNRS, Université de Marseille
Yves Denizot – Chargé de Recherche INSERM, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Thématique 524 : Biologie, Santé, « Bio-santé »

Faculté des Sciences et techniques

Laboratoire UMR CNRS 6101

« Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et Lymphoprolifération »

Thèse n°30-2010

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie

présentée et soutenue publiquement par

Christelle VINCENT-FABERT

Le 27 septembre 2010

ETUDE DU RÔLE DE LA REGION REGULATRICE 3'RR DU LOCUS IgH DANS LA LYMPHOPOÏESE B ET LA LYMPHOMAGENESE B PAR DES MODELES *IN VIVO*

Directeur de thèse : Yves Denizot

Jury :

Président : **Marie-Odile Jauberteau** – Professeur, Université de Limoges
Rapporteurs : **Pierre Dubus** – Professeur, Université de Bordeaux
François Rougeon – Directeur de Recherche, Université de Paris
Examineurs : **Estelle Duprez** – Chargé de Recherche CNRS, Université de Marseille
Yves Denizot – Chargé de Recherche INSERM, Université de Limoges

RESUME

Le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit de nombreux remaniements géniques au cours de la maturation B (recombinaisons VDJ, recombinaison isotypique ou « switch », hypermutation somatique). Ils sont orchestrés par différents éléments *cis*-régulateurs. Ceux, situés en 3' des gènes constants, constituent la région 3'RR. Elle est composée de quatre activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1-2, hs3b et hs4) répartis sur 30 kb. La première partie de mon travail a consisté en l'étude du rôle de la région 3'RR dans la lymphopoïèse B par une approche « Knock-Out » (KO) de l'élément hs4 et de la totalité de la région 3'RR. Nous avons confirmé l'existence d'une redondance dans l'activité des éléments de cette région et son importance cruciale dans les processus de « switch » et de synthèse d'Ig. En parallèle, nous avons étudié sa contribution dans la lymphomagenèse B ; les recombinaisons géniques constituant une zone critique pour des événements de translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation d'oncogènes, tels que *c-myc* au cours du lymphome de Burkitt (LB). La région 3'RR seule est capable d'induire la surexpression de *c-myc* dans les souris *c-myc*-3'RR et de mimer l'apparition de tumeurs de type Burkitt *in vivo* possédant de nombreuses caractéristiques du LB humain comme les hypermutations en 5' et 3' des promoteurs du *c-myc* transgénique.

SUMMARY

The immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes many genetics recombinations during B cell maturation (VDJ recombination, class switch recombination and somatic hypermutation). These different events are regulated by several *cis*-regulatory elements. Those, presents at the 3' of constant genes, define the 3' regulatory region (3'RR). It is composed of four transcriptionnal activators named hs3a, hs1,2, hs3b and hs4, lying on a 30 kb-long DNA fragment. Firstly, I have investigated the *in vivo* role of the 3'RR in B cell development by creating Knock-Out (KO) models of the hs4 element and of the entire 3'RR. Results confirm the redundancy in the activity of the 3'RR elements and we show that the whole 3'RR is of dramatic importance for the class switch recombination process and Ig synthesis. We have also investigate the role of the 3'RR in B cell lymphomagenesis ; all the genetics recombinations being critical for chromosomal translocation events which cause oncogene deregulation, like *c-myc* in Burkitt lymphoma (BL). The 3'RR can induce *c-myc* surexpression in *c-myc*-3'RR mice and mimic the emergence of Burkitt tumors *in vivo* with the same characteristics of human BL including the occurence of numerous somatic mutations lying 5' and 3' of the transgenic promoters P1/P2.

REMERCIEMENTS

Et voilà, l'aventure de la thèse se termine ! Ces quatre années ont été pour moi très enrichissantes sur le plan scientifique mais aussi humain. C'est un travail bien évidemment personnel mais qui ne peut se réaliser seul. C'est pourquoi, je souhaite, ici, remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à cette aventure.

Mes premiers remerciements vont à Yves DENIZOT. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces quatre années, merci pour votre aide et vos multiples conseils.

Merci au Professeur Michel Cogné de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Ensuite, je tiens à remercier les membres de jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci à Pierre Dubus et François Rougeon pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'en être rapporteurs ; Estelle Duprez et Yves Denizot pour en avoir été examinateurs. Un grand merci à Marie-Odile Jauberteau pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Merci à Estelle Duprez pour son chaleureux accueil à Marseille. J'espère de tout cœur pouvoir écrire très prochainement une nouvelle histoire dans son laboratoire.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'UMR CNRS 6101 pour tous les bons moments passés ensemble. Un grand merci à Eric pour sa précieuse aide, sa gentillesse et sa bonne humeur toujours au rendez-vous. Ne change rien !

Merci à Carine, Cendrine, Christophe, Laurent, Sébastien, Sophie, Chahrazed. Bon courage aux prochains : Rémi, Marie, Fabien, Brice, Pauline.

Un grand merci à AT et GC, bon courage pour votre thèse. Merci pour votre gentillesse et vos nombreux délires ! Un gros bisou à Lorenzo et Marie.

Merci également à Rada. Bon courage à toi pour la suite, je te souhaite beaucoup de bonheur et n'oublie pas « le fond Balb-c est d'allotype a/a alors que le fond C57/BL6 est d'allotype a/b » !

Merci également à Virginie pour sa gentillesse, ses conseils de fin de thèse. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Je tiens maintenant à remercier la plus magnifique des Claire berrichonnes. Merci à toi pour ta bonne humeur, ta franchise, ton optimisme, qui, lors de mes instants de doute, ont pu me remonter le moral !

Merci aussi à Zéliha. Tu me connais depuis que je suis toute petite dans le monde universitaire ! Sache que j'adorais aller en TP de microbio, c'était un des meilleurs moments de la semaine (vendredi matin !). Je ne sais pas si, pour toi, c'était réciproque car, en première année de licence, les étudiants sont encore un peu jeunes dans leur tête et trop dissipés !

C'est avec une grande émotion que je tiens maintenant à remercier le meilleur des creusois lyonnais : Christian. Merci à toi pour ta gentillesse, pour toutes les commandes passées, pour toutes les discussions sur notre amour de toujours : la bicyclette !

J'ai également une pensée pour Anne-Gaëlle, une ancienne du labo ! Bon courage pour ta nouvelle vie aux « States ».

Enfin mes derniers remerciements concernant le labo reviennent à la meilleure de nous tous : Christelle ! Mais non pas moi, je veux bien sûr parler de l'autre Christelle, la « Christelle pas Vincent » ! Merci pour ta bonne humeur, ton énorme gentillesse. Grâce à toi, je suis devenue le meilleur padawan du western blot (j'ai toujours le trophée !). Merci pour toutes ces soirées passées ensemble et tous les moments de complicité que seules les Christelle peuvent comprendre !

Je tenais également à remercier les filles de l'ombre : Sylvie et Bernadette qui font un travail remarquable à l'animalerie. Sachez que, sans vous, nous ne serions rien. Merci beaucoup à toutes les deux de faire votre travail avec autant d'énergie et de mental car il est vrai que, parfois, on vous rend la vie un peu dure !

Merci également à l'équipe B-Cell Design : Jean, Armelle et Gaël (« le chef »). Bonne chance, prospérité et longue vie à votre entreprise. Un merci tout particulier à Gaël pour son énorme gentillesse, ses magnifiques plats. Je n'oublierai jamais tes maladresses et tes magnifiques chutes en VTI, des moments insolites ! Un petit mot maintenant pour « les copines »... Cécile et Marie. A cet instant je suis très émue car je repense à tous ces moments passés ensemble dans la « grotte » : la pause café à 10h (rassure-toi chef, ça ne durait pas plus de 10 minutes !!), les sandwiches milanais ou montagnards à midi, et que dire du nombre de cookies qu'on a pu partager !!! Je pense qu'avec toutes les discussions que l'on a eues, je pourrais écrire une seconde thèse !!! Marie, « two to you too » jeudi ? N'oublie pas tes affaires ! Tout ça va bien me manquer. Merci encore les filles pour tout. Je n'oublie pas, bien sûr, vos hommes : Maxence (le petit loup), Christophe et Romain. Gros bisous à eux,

Un grand merci à toute l'équipe du 2^{ème}. Je remercie particulièrement Nathalie pour sa gentillesse, son sourire et son joli accent toulousain ! Bonne chance à toi pour l'avenir. Merci aussi à Stéphanie et Aurélie pour leur sympathie et les nombreuses discussions de « thésardes » ! Bon courage à vous pour la suite. Enfin, un petit coucou à Estelle : bonne chance pour ta thèse et merci pour tous les souvenirs des premières années de fac ! C'était une belle époque !

Je ne vais bien évidemment pas oublier mes niçois préférés : Virginie et Lionel. Merci pour tout ! Vous me manquez énormément. J'espère, dans les prochaines années, que l'on pourra se voir plus souvent. Je vais essayer de me rapprocher géographiquement de vous, je vous amènerai de la bonne viande et, en échange, vous me donnerez les glaces ! T'inquiète pas Lionel, je t'en laisserai ! Merci aussi de nous avoir fait découvrir le magnifique département du Lot ainsi que ses chaleureux habitants. Virginie, merci d'avoir été à mes côtés ce fameux samedi de juillet 2008, le plus beau jour de ma vie ! Merci pour tous ces merveilleux moments passés ensemble au labo, à se soutenir.

Je tenais également à remercier les physiciens Julien, Seb, Juliette, Vincent et Raphaël pour leur soutien et leur amitié. Merci aussi à Coralie et Mathieu, je vous souhaite plein de bonheur. Un grand merci à Manu et Marie pour toutes les bonnes soirées passées ensemble.

Merci également à Jean-Louis et Michelle pour leurs encouragements et leur chaleureux accueil.

Enfin, je voudrais remercier toute ma famille qui m'a énormément soutenue lors de ce périple. Merci tout d'abord à ma soeurette et à mon beau-frère préféré, Seb pour vos encouragements et votre aide. Je vous souhaite beaucoup de bonheur. Un grand merci à ma maman qui m'a énormément soutenue tout au long de mes études. Cette année est, pour toi aussi, une année importante, je te souhaite tout l'épanouissement possible dans ce nouveau travail. Merci d'avoir toujours été présente pour moi et de tout faire pour mon bonheur. Merci à ma tata chérie et à Christian pour leurs encouragements.

Merci également à ma belle-famille, en particulier, Mamie Paulette, Maryline et Jean-Claude pour leur soutien.

Mes derniers remerciements sont bien sûr pour ma moitié, mon mari : merci Marc pour ton amour, ta tendresse, ton immense humour. Merci d'avoir été présent à mes côtés pendant ces quatre années pour m'encourager. Bon courage pour la fin de ta thèse. Et oui, tu es le prochain sur la liste !

Mes dernières pensées iront à mon père. Je te dédie tout ce travail et j'espère que, de là-haut, tu es fier de moi.

À mon père,

PUBLICATIONS

Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur J Immunol.* **2010 Nov 15.** [Epub ahead of print].

Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the 3' regulatory elements controlling IgH class switch recombination and plasma cell hypertranscription. *Blood.* **2010 Sep 16;116(11):1895-8.** Epub 2010 Jun 10.

Fiancette R, Amin R, Truffinet V, Vincent-Fabert C, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies. *Leuk Res.* **2009 Dec 15.**

Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol.* **2009 Jun1;182(11):6926-32.**

Vincent-Fabert C, Fiancette R, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene. *Leuk Res.* **2009 Nov;33(11):e203-6.** Epub 2009 Jun 12.

Vincent C, Truffinet V, Fiancette R, Petit B, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Uncoupling between Ig somatic hypermutation and oncogene mutation in mouse lymphoma. *Biochim Biophys Acta.* **2009 Feb;1793(2):418-26.** Epub 2008 Nov 3.

COMMUNICATIONS

Communications écrites :

Vincent Christelle, Cogné Nadine, Cogné Michel, Denizot Yves. Dérégulation du locus endogène de chaînes lourdes d'immunoglobulines par "knock-out" et "knock-in" au sein des activateurs 3'. 2^{ème} Journée scientifique de l'IFR et journée des doctorants et post-doctorants, Limoges 29 Janvier 2009.

Vincent Christelle, Fiancette Rémi, Cogné Nadine, Cogné Michel, Denizot Yves. Dérégulation du locus endogène de chaînes lourdes d'immunoglobulines par « KNOCK-OUT » au sein des activateurs 3'. 2^{ème} Colloque Lymphocytes B normaux et tumoraux, Île d'Oléron 9-31 mai 2008.

Communication orale :

Vincent Christelle, Fiancette Rémi, Denizot Yves. La modélisation animale : Mise au point de modèles transgéniques mimant des dysfonctionnements de la maturation des lymphocytes B. Séminaire de la pluridisciplinarité, Limoges 12 juin 2008.

ABREVIATIONS

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNsb : ADN simple brin

ARN : acide ribonucléique

AID : cytidine désaminase induite par activation

B : lymphocyte B

BAC : chromosome artificiel bactérien

BCR : récepteur des cellules B

BER : voie de réparation par excision d'une base

C : région constante

ccnd : gène codant pour les cyclines D

Cdk : kinase dépendante des cyclines

CG : centre germinatif

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CSR : commutation de classe

D : segment de diversité

DNase I : désoxyribonucléase I

dC : cytosine

dU : uracile

Fc : récepteur des immunoglobulines

FDC : cellule folliculaire dendritique

HLH : hélice-boucle-hélice

hs : site hypersensible à la DNase I

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IgH : locus de chaînes lourdes d'immunoglobulines

IL : interleukine

J : segment de jonction

kb : kilobase

KO : « knock-out », délétion de gène par recombinaison homologue

LB : lymphome de Burkitt

LPS : lipopolysaccharide bactérien

LZ : « leucine zipper »

MAR : région d'ancrage à la matrice

MB I-IV : boîtes Myc I à IV

MMR : « mismatch repair », voie de réparation de l'ADN

neo^R : gène de résistance à la néomycine

NES : site d'exportation nucléaire

NHEJ : jonction d'extrémités non homologues

NLS : site de localisation nucléaire

pb : paire de bases

pgk : promoteur de la phosphoglycérate kinase

PKA : protéine kinase A

pRb : protéine du rétinoblastome

pV_H : promoteur des région variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines

RAG : gène activant la recombinaison VDJ

RSS : séquence signal de recombinaison

S : région switch

SHM : hypermutation somatique

T : lymphocyte T

TGF : « transforming growth factor »

TH : lymphocyte T auxiliaires « helper »

tk : gène codant pour une thymidine kinase

UNG : uracil glycosilase

V : région variable

3'RR : région régulatrice 3' du locus IgH

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	7
I. ORGANISATION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES	9
I.1. Loci des chaînes légères	9
I.2. Locus des chaînes lourdes	9
II. FORMATION D'UN GRAND REPERTOIRE B	13
II.1. Constitution d'un répertoire B primaire	13
<i>II.1.1. Les étapes précoces du développement B dans la moelle osseuse</i>	<i>13</i>
<i>II.1.2. Mécanisme des recombinaisons V(D)J.</i>	<i>15</i>
II.2. Diversification secondaire du répertoire	19
<i>II.2.1. Les étapes du développement B en périphérie</i>	<i>19</i>
<i>II.2.2. Les recombinaisons secondaires</i>	<i>21</i>
II.2.2.1. L'hypermutation somatique	21
II.2.2.2. La commutation isotypique	23
<i>II.2.3. Sélection clonale</i>	<i>25</i>
II.3. Mécanisme de recombinaisons secondaires	27
<i>II.3.1. Rôle de AID dans la génération du répertoire secondaire</i>	<i>27</i>
<i>II.3.2. AID et l'hypermutation somatique</i>	<i>31</i>
II.3.2.1. Recrutement de AID à la région variable	31
II.3.2.2. Réparation	33
<i>II.3.3. AID et la commutation isotypique</i>	<i>35</i>
II.3.3.1. Facteurs importants pour le <i>switch</i>	35
• La transcription germinale	35
• Les régions <i>switch</i> (S)	37
II.3.3.2. Modèle de recombinaison de classe	41
II.3.3.3. Cytokines impliquées dans le <i>switch</i>	43
III. LA REGULATION DES GENES DU LOCUS IGH	45
III.1. Les promoteurs	45
<i>III.1.1. Les promoteurs pV_H</i>	<i>45</i>

III.1.2. Le promoteur/activateur DQ52	45
III.1.3. Les promoteurs I	47
III.2. L'activateur intronique E μ	47
III.3. La région régulatrice située en 3'RR du locus IgH	51
III.3.1. Historique.....	51
III.3.2. Activité de cette région 3'	53
III.3.3. Synergie entre les éléments 3' du locus IgH.....	55
III.3.4. Rôles de la région 3'RR dans le développement B.....	57
III.3.4.1. La région 3'RR et les recombinaisons secondaires	57
III.3.4.2. Expression du locus IgH.....	61
IV. IMPLICATION DE LA REGION 3'RR DANS LA LYMPHOMAGENESE.....	63
IV.1. Rappels sur le phénomène de translocation et l'apparition de lymphomes	63
IV.2. Surexpression de <i>c-myc</i> et lymphomagenèse	65
IV.2.1. Rôle physiologique de <i>c-myc</i>	65
IV.2.1.1. Structure génique et protéique.....	65
IV.2.1.2. Fonction de la protéine c-Myc	67
• c-Myc et le cycle cellulaire	67
• c-Myc et la différenciation cellulaire	69
• c-Myc et l'apoptose.....	69
IV.2.2. Translocation du gène <i>c-myc</i> et Lymphome de Burkitt.....	71
IV.3. Dérégulation de l'expression de <i>c-myc</i> transloqué par la région 3'RR.....	73
IV.4. Mutations au niveau du <i>c-myc</i> transloqué.....	73
IV.5. Cdk4 et lymphomagenèse	75
IV.5.1. Rôle physiologique de <i>cdk4</i>	75
IV.5.1.1. Structure génique et protéique.....	75
IV.5.1.2. Fonction de la protéine cdk4 dans le cycle cellulaire.....	77
IV.5.2. Implication de <i>cdk4</i> dans l'oncogénèse.....	77
OBJECTIFS.....	81
RESULTATS	85
Article 1 : Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region.....	89

Article 2 : Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes.....	93
Article 3 : Uncoupling between Ig somatic hypermutation and oncogene mutation in mouse lymphoma.	95
Article 4 : Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene.	99
Article 5 : Cdk4 does not impede B cell maturation but cooperates with c-myc in the generation of chronic B-cell lymphocytic leukeamia in transgenic mice.....	101
DISCUSSION-PERSPECTIVES	105
ANNEXES.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	127
VALORISATION DES COMPETENCES «LE NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE»	161
I. CONTEXTE ET ENJEUX DE LA THESE	163
II. DEROULEMENT ET GESTION DE LA THESE	167
III. COMPETENCES DEVELOPPEES DANS LE CADRE DU PROJET	179
IV. RESULTATS ET IMPACT DE LA THESE	183

INTRODUCTION GENERALE

Le système immunitaire est un système de défense qui existe chez de nombreux organismes mais dont la forme la plus évoluée est retrouvée chez les vertébrés supérieurs. Il consiste en un ensemble de moyens (organes, tissus, cellules et molécules) permettant à un organisme de reconnaître et tolérer ce qui lui est propre (les antigènes du soi) mais aussi de reconnaître et rejeter ce qui lui est étranger (les antigènes du non-soi). Cette fonction permet alors d'assurer la défense de l'organisme contre des pathogènes (bactériens, viraux ou parasitaires) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. A l'intérieur de ce système de protection, la réponse immunitaire humorale repose sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac) par les cellules de la lignée lymphocytaire B. Ces molécules sont capables de lier spécifiquement un antigène en vue de le neutraliser ou de l'éliminer.

Les Ig sont des hétérodimères protéiques, d'environ 150 kDa, exprimées à la surface des lymphocytes B ou excrétées par les plasmocytes. Elles sont composées de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques et de deux chaînes légères (L pour Light) identiques reliées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 1**). La plupart des vertébrés possède deux types de chaînes légères (κ et λ), qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chez la souris, les IgG sont subdivisées en sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. La comparaison des séquences protéiques des chaînes lourdes et légères a permis de distinguer deux régions rendant compte de la dualité fonctionnelle et structurale des Ig. La partie amino-terminale, appelée variable V, est très différente d'une chaîne à une autre ; les régions variables des chaînes lourdes et légères interagissent pour former le site de fixation de l'antigène déterminant ainsi la spécificité de l'Ig (**Figure 1**). La partie carboxy-terminale est, elle, très conservée entre les chaînes légères d'un même type et les chaînes lourdes d'une même classe. Cette région constante C confère à l'Ig ses fonctions effectrices (fixation de certains composants du complément, interaction avec des récepteurs spécifiques à la surface d'autres types cellulaires...).

La différenciation lymphocytaire B repose sur un programme complexe d'activation génique contrôlant la transcription des gènes d'Ig et leur accessibilité à des remaniements majeurs par recombinaison ou mutation. Dans un premier temps, les recombinaisons V(D)J établissent le répertoire primaire des Ig. Puis, une diversification secondaire, résultant des recombinaisons de classe (changement d'isotype) et de l'hypermutation somatique, survient dans les cellules B matures. Tous ces événements sont sous le contrôle de multiples éléments *cis*-régulateurs agissant de façon synergique. Lors de ces recombinaisons géniques, le locus IgH codant les chaînes lourdes, constitue une zone critique pour des

évènements de translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation transcriptionnelle d'oncogènes, due à leur juxtaposition aux puissants activateurs transcriptionnels des différents loci.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés, tout particulièrement, au locus IgH. C'est pourquoi l'introduction bibliographique sera essentiellement consacrée aux processus qui affectent ce locus.

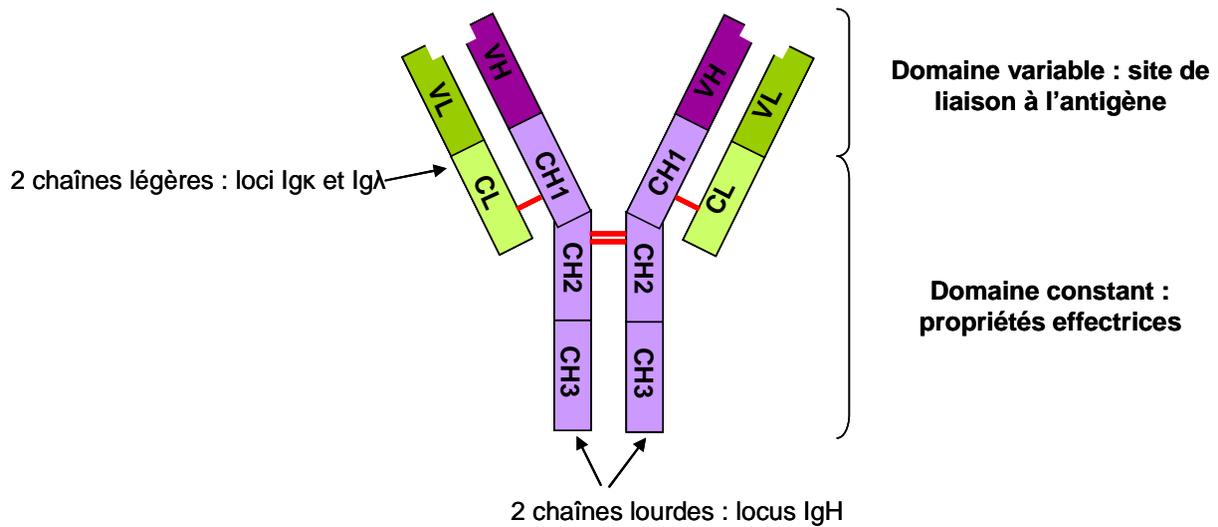


Figure 1 : Structure des Immunoglobulines (Ig).

Représentation d'une IgG1 de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en violet, les chaînes légères en vert et les ponts disulfure en rouge. VH et VL sont les régions variables des chaînes lourdes et légères. CH et CL sont les régions constantes des chaînes lourdes et légères.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. ORGANISATION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES

Il existe trois complexes génétiques distincts impliqués dans la synthèse d'Ig : les loci Ig κ et Ig λ codant les chaînes légères et le locus IgH codant les chaînes lourdes. Chaque complexe est composé de segments variables (V), de segments de jonction (J) et de gènes codant les régions constantes. Les segments de diversité (D) n'existent qu'au niveau du locus IgH.

I.1. Loci des chaînes légères

Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 6 chez la souris (sur le chromosome 2 chez l'homme). La disposition germinale du locus Ig κ murin comprend 140 segments V κ (93 segments fonctionnels et 47 pseudogènes) répartis en 18 familles et 5 segments J κ (dont 4 fonctionnels). Ces segments V κ et J κ codent la partie variable de la chaîne légère κ . Un seul C κ code la partie constante (**Figure 2**).

Les gènes des chaînes légères λ situés sur le chromosome 16 chez la souris (chromosome 22 chez l'homme), sont répartis en 4 familles comprenant chacune une paire de segments J λ et C λ (J λ_1 à J λ_4 et C λ_1 à C λ_4). Le locus murin ne contient que trois segments V λ ; V λ_1 s'associant préférentiellement à J λ_1 et J λ_3 tandis que V λ_2 et V λ_3 s'associent à J λ_2 (J λ_4 et C λ_4 étant défectifs) (**Figure 2**).

I.2. Locus des chaînes lourdes

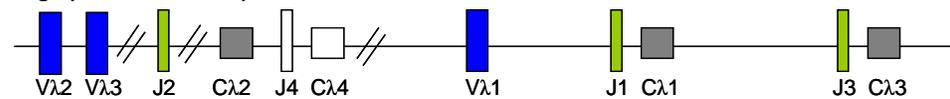
Les gènes des chaînes lourdes sont situés sur le chromosome 12 chez la souris (chromosome 14 chez l'homme) et s'étendent sur plus de trois mégabases. Il comprend 150 à 200 segments V $_H$ (dont une partie de pseudogènes), regroupés en 15 familles. Près de la moitié des segments V $_H$ appartient à la famille J558. Le locus IgH comporte également 12 segments D $_H$ et 4 segments J $_H$ suivis de huit gènes codant les régions constantes des 8 classes et sous-classes d'Ig : μ , δ , γ_3 , γ_1 , γ_2b , γ_2a , ϵ et α (**Figure 2**). Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ainsi que les régions charnières pour certaines Ig. Enfin, des exons indépendants codent les régions intra-cytoplasmiques et trans-membranaires pour chaque isotype.

Dans leur configuration germinale, les gènes des chaînes lourdes et légères d'Ig ne sont pas accessibles et ne sont donc pas fonctionnels. Ces gènes sont uniquement exprimés dans la lignée lymphocytaire B où ils subissent des modifications internes ou réarrangements intra-géniques : c'est la différenciation lymphocytaire B.

Locus Ig κ (chromosome 6)



Locus Ig λ (chromosome 16)



Locus IgH (chromosome 12)

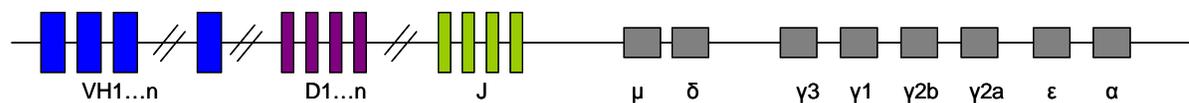


Figure 2 : Représentation schématique des loci codant les Ig chez la souris.

Les segments variables V sont en bleu, les segments de diversité D en violet, les segments de jonction J en vert et blanc et les gènes constants C en gris et blanc.

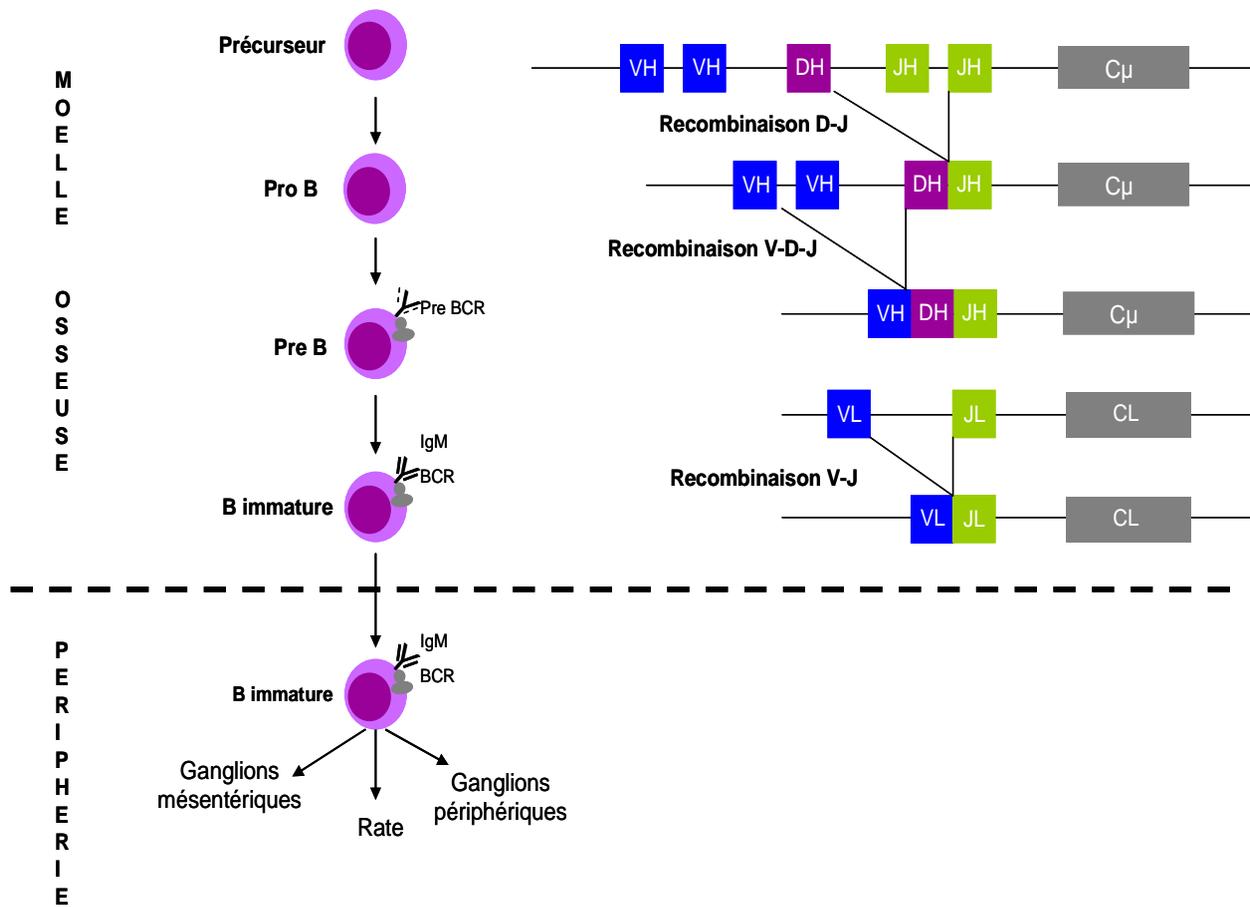


Figure 3 : Différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse : constitution du répertoire B primaire.

II. FORMATION D'UN GRAND REPERTOIRE B

II.1. Constitution d'un répertoire B primaire

II.1.1. Les étapes précoces du développement B dans la moelle osseuse

Les premières étapes de la différenciation débutent dans la moelle osseuse en l'absence de stimulation antigénique. Il s'agit de plusieurs recombinaisons intra-géniques qui touchent uniquement la région d'ADN qui code la partie variable des chaînes lourdes et légères. Elles consistent en l'association d'un segment V, d'un segment D (pour les chaînes lourdes) et d'un segment J : ce sont les recombinaisons V(D)J. Les premiers réarrangements ont lieu sur le locus IgH à partir du **stade pro-B** où un segment D_H et un segment J_H forment un segment D-J sur les deux allèles. Un second réarrangement aura lieu au **stade pré-B** entre un segment V_H et le segment joint D-J et formera le segment V-D-J codant la région variable de la chaîne lourde (**Figure 3**). Si ce réarrangement est productif, l'ARNm est fonctionnel (cadre de lecture correct) : une chaîne μ est alors produite. Elle peut être exprimée à la membrane de la cellule sous la forme pré-BCR (pre-B Cell Receptor) en association avec une pseudo-chaîne légère codée par les gènes *Vpré-B* et $\lambda 5$ (Melchers et al., 1993) et avec les molécules de transduction du signal intracellulaire Ig α et Ig β . L'expression du pré-BCR permet à la cellule de passer au stade suivant de différenciation (**stade B immature**) où les réarrangements V_L-J_L s'effectuent sur le locus des chaînes légères (κ tout d'abord, puis λ si les réarrangements κ ne sont pas fonctionnels). La chaîne légère créée va remplacer la pseudo-chaîne légère et une IgM de surface va alors être exprimée à la membrane de la cellule. Pour les chaînes lourdes et légères, il existe un mécanisme de régulation appelé exclusion allélique qui permet de bloquer les réarrangements lorsque ceux-ci sont fonctionnels sur un allèle. Ainsi, la cellule n'exprime qu'un seul type de BCR à sa surface, associé aux molécules Ig α et Ig β . Toute cellule incapable d'assembler son pré-BCR, ou d'associer et de transporter à la membrane une chaîne lourde μ puis une chaîne légère κ ou λ , sera éliminée par apoptose : c'est la sélection positive. Les lymphocytes B immatures sont quant à eux sujets à un processus de sélection négative, où les cellules possédant des Ig membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées par apoptose (Melchers et al., 1993). Ces cellules peuvent avoir une seconde chance grâce au phénomène d'*editing* qui permet de créer une nouvelle chaîne légère qui, une fois associée à la chaîne lourde, ne produit plus un BCR autoréactif (Hertz and Nemazee, 1997; Melamed and Nemazee, 1997; Pelanda et al., 1997; Tiegs et al., 1993)

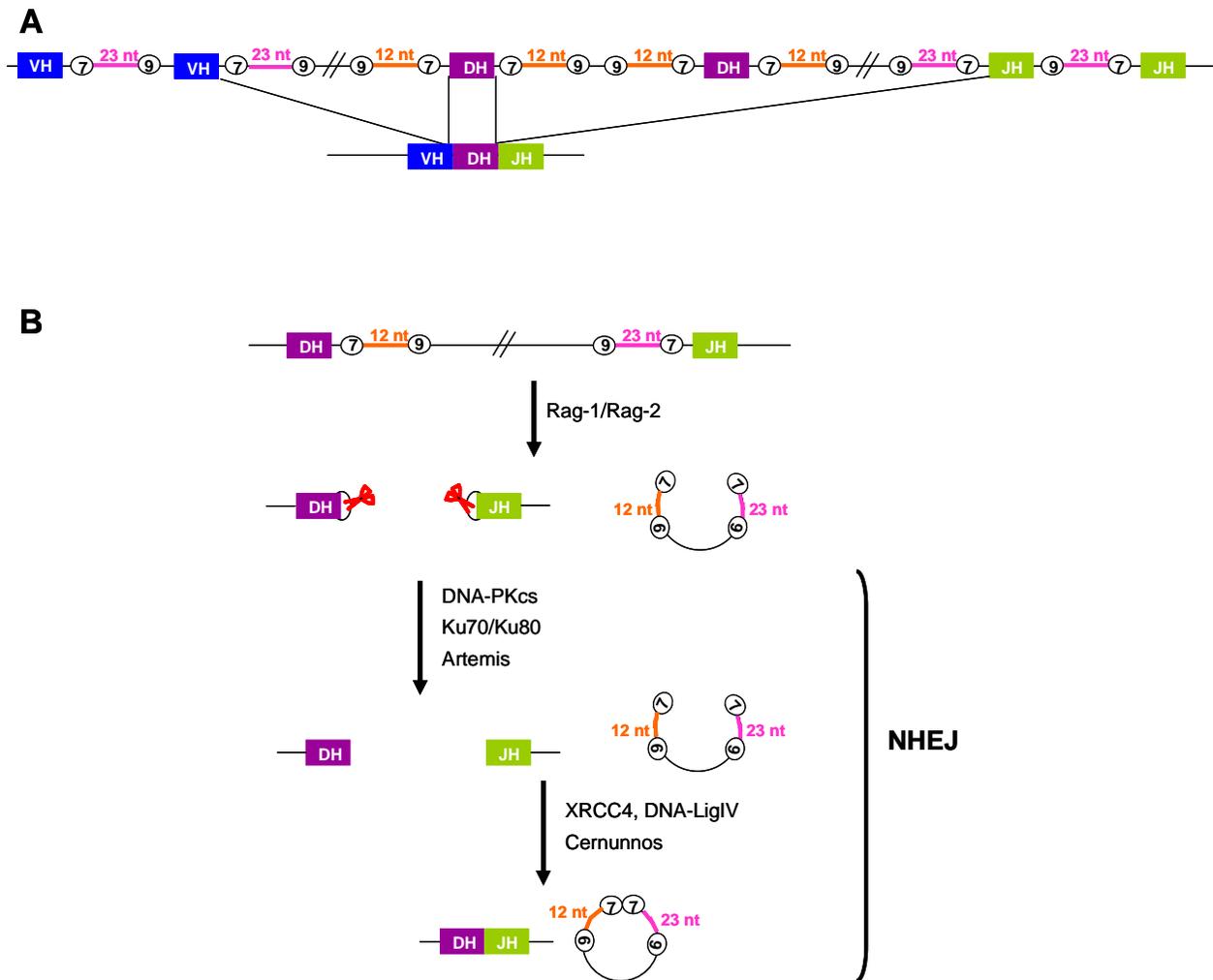


Figure 4 : Réarrangements des gènes variables du locus IgH.

A. Recombinaisons VDJ selon la règle 12/23.

Les segments V sont en bleu, les segments D en violet et les J en vert. Les séquences signal de recombinaison (RSS) constituées de sept et neuf nucléotides, sont représentées par des cercles blancs. Ces séquences très conservées sont séparées par des régions de 12 (segment orange) ou 23 nucléotides (segment rose). La recombinaison s'effectue entre RSS comportant un séparateur de taille différente. Ainsi, les recombinaisons ne peuvent se faire qu'entre un D et un J puis un V et un DJ réarrangé.

B. Mécanisme de réparation mis en jeu lors des recombinaisons VDJ.

Les protéines RAG induisent une coupure de l'ADN au niveau de l'heptamère. Les cassures double brin vont ensuite être reconnues et réparées grâce à l'intervention des protéines de la voie Non Homologous End Joining (NHEJ).

Une cellule immature conservant son autoréactivité malgré son *editing* peut encore entrer en anergie (Goodnow et al., 1988; Vilen et al., 1997) ou être éliminée par apoptose (Hartley et al., 1993; Norvell et al., 1995). Les cellules qui survivent à cette double sélection, quittent la moelle osseuse et utilisent la circulation sanguine pour migrer vers les organes lymphoïdes périphériques où elles pourront subir les prochaines étapes de la maturation.

II.1.2. Mécanisme des recombinaisons V(D)J.

Les recombinaisons entre les différents segments codant les régions variables de chaînes lourde et légère s'effectuent à des sites spécifiques nommées RSS (séquence signal de recombinaison). Les RSS sont constituées de deux motifs consensuels très conservés de sept et neuf nucléotides (heptamère CACAGTG et nonamère ACAAAAACC), séparés par des régions de 12 ou 23 nucléotides aléatoires (Tonegawa, 1983) (**Figure 4a**). La recombinaison s'effectue entre RSS comportant un séparateur de taille différente (règle 12/23). Les RSS sont situées en 5' et/ou en 3' des segments à assembler, de façon à ce que les recombinaisons ne puissent se faire qu'entre segments D_H et J_H puis entre V_H et D_H-J_H pour les chaînes lourdes, et entre V_L et J_L pour les chaînes légères. Ainsi, chaque segment D_H est flanqué du même type de RSS en 5' et 3', ne l'autorisant à réarranger qu'avec les RSS compatibles d'un V_H en 5' et d'un J_H en 3' et évitant la formation d'exons V_H-J_H ou V_H-D-D-J_H (Honjo, 1983; Meek et al., 1989).

Les recombinaisons V(D)J mettent en jeu une machinerie enzymatique composée des protéines RAG-1 et RAG-2 (pour *Recombinaison Activating Gene*). L'inactivation de RAG-1 ou RAG-2 par recombinaison homologue aboutit à un blocage complet du développement B aux stades précoces (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). Ces deux protéines sont exprimées de manière simultanée, exclusivement dans les lymphocytes B et T et spécifiquement aux stades de développement durant lesquels ont lieu les réarrangements V(D)J (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989). Elles interviennent dans l'assemblage des régions variables des gènes d'Ig mais également dans celles du récepteur des cellules T. L'expression de ces deux gènes est extrêmement bien contrôlée : une première stimulation d'expression survient aux stades pro-B permettant les réarrangements au niveau du locus IgH, puis au stade pré-B pour les réarrangements des gènes de chaînes légères.

Les protéines RAG induisent une coupure endonucléolytique à l'extrémité de l'heptamère. Les segments générés par un tel clivage sont réassociés via un mécanisme faisant intervenir la voie *Non Homologous End Joining* (NHEJ), voie prédominante de réparation des cassures double brin de l'ADN dans les cellules de mammifères. Quatre

extrémités libres sont formées après la cassure : deux extrémités « codantes » en épingle à cheveux et deux extrémités « signal » phosphorylées en 5' (**Figure 4b**). La voie NHEJ met en jeu plusieurs facteurs dont Ku70/Ku80, DNA-PKcs, XRCC4 ligase IV, Artemis et Cernunnos (Dudley et al., 2005; Schlissel, 2003). Les facteurs Ku70 et Ku80 sont ensuite recrutés par le complexe contenant les protéines RAG au site de coupure et vont ainsi 1) protéger l'ADN au niveau des coupures afin d'éviter sa dégradation ; 2) rapprocher les segments d'ADN en vue de la ligature ; 3) recruter ou activer les protéines de réparation. La kinase DNA-PKcs (Sérine/Thréonine kinase) est recrutée et phosphoryle Artemis qui possède alors une activité endonucléasique lui permettant d'ouvrir les structures en épingles à cheveux formées au lieu de coupure (Ma et al., 2002). La ligature est ensuite assurée par les facteurs Ligase IV, Cernunnos et XRCC4 (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006; Sekiguchi and Ferguson, 2006).

La jonction codante est imprécise et peut comporter de courtes délétions, des additions de duplication palindromique (appelés éléments P) dues à la formation transitoire d'épingles à cheveux ou de courtes insertions de séquences riches en G/C appelées N ajoutées par la Terminale deoxynucléotidylTransférase (TdT) avant la ligature des extrémités codantes. Cette cascade de réaction aboutit à la juxtaposition des segments recombinés avec une importante flexibilité jonctionnelle qui augmente la diversité des régions variables. Un défaut dans la voie de réparation NHEJ entraîne un sévère déficit immunitaire (*Severe Combined Immune Deficiency, SCID*) caractérisé par un arrêt de la maturation B et T (Blunt et al., 1995; Buck et al., 2006; Nussenzweig et al., 1996; Taccioli et al., 1994; Zhu et al., 1996), accompagné d'une létalité embryonnaire pour les déficiences en XRCC4 et Ligase IV (Dudley et al., 2005; Revy et al., 2005; Soulas-Sprauel et al., 2007).

Le grand nombre de segments V, D et J disponibles, les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire) ainsi que l'imprécision de leur jonction (diversité jonctionnelle) contribuent à la multiplicité des Ig et constituent un premier grand répertoire B.

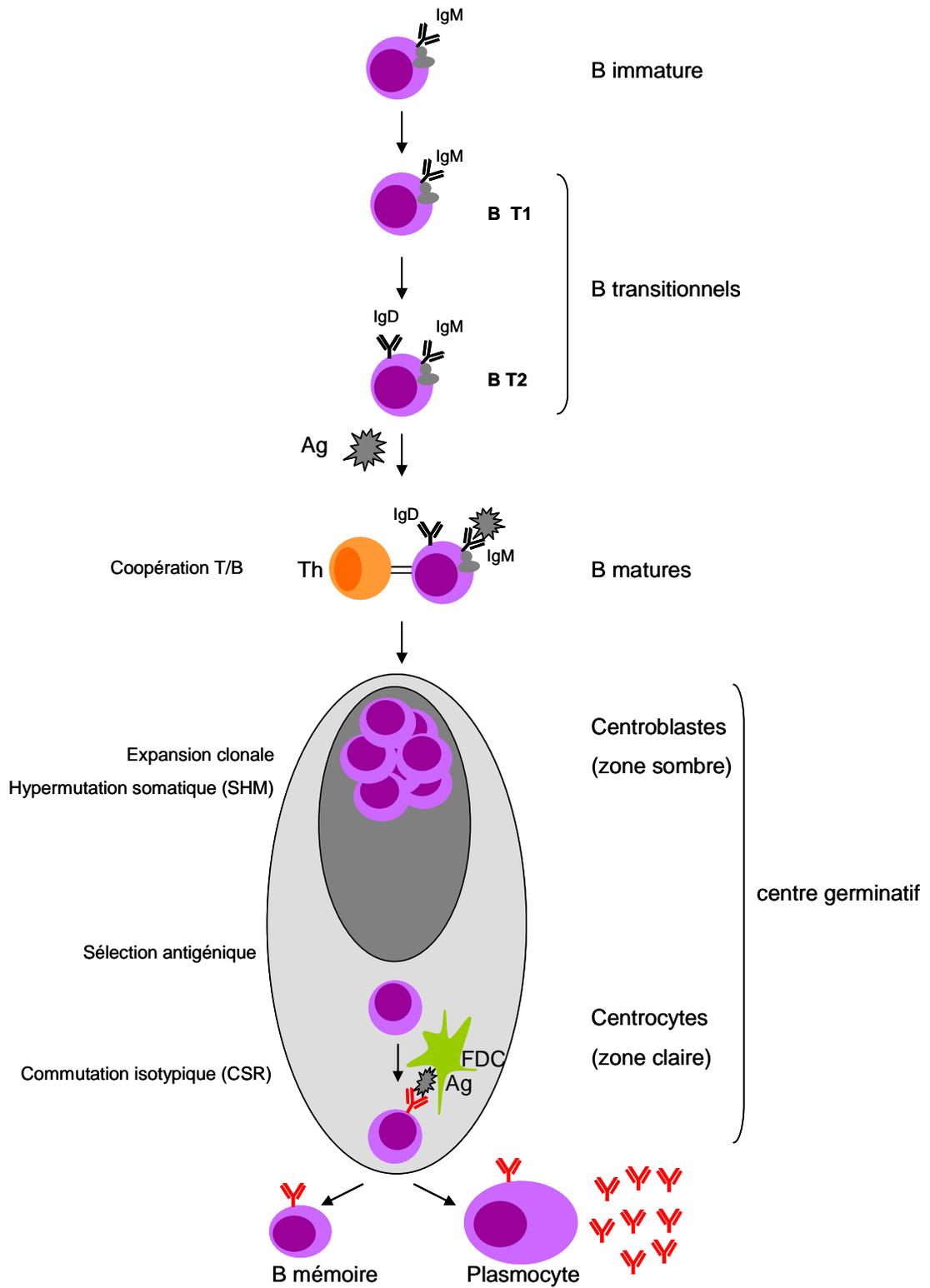


Figure 5 : Diversification du répertoire primaire en périphérie, suite à une rencontre antigénique.

Ag : Antigène ; Th : lymphocyte T helper ; FDC : Cellule Folliculaire Dendritique

II.2. Diversification secondaire du répertoire

II.2.1. Les étapes du développement B en périphérie

La formation de ce second répertoire B se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer) et nécessite la présence d'un antigène : il s'agit de la phase dépendante de l'antigène. Il en résulte la formation de cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes) et de cellules B mémoires (**Figure 5**).

Les cellules B immatures qui ont quitté la moelle osseuse passent à un stade intermédiaire, le **stade B transitionnel**, durant lequel vont avoir lieu des modifications induites par le BCR. Ce stade constitue la dernière étape avant la rencontre avec des antigènes exogènes. Ces cellules font le lien entre les cellules B immatures de la moelle osseuse et les cellules B matures périphériques. Il s'agit d'une étape importante de la maturation B puisque c'est à ce moment là que la cellule va perdre sa sensibilité à la sélection négative par le BCR, gagner les follicules de la rate et devenir sensible aux signaux induits par les lymphocytes T. Le compartiment B transitionnel est divisé en deux populations :

- les **B transitionnels de type 1 (T1)**, dont le phénotype est proche de celui des cellules B immatures de la moelle osseuse avec peu ou pas d'expression d'IgD membranaire, une forte expression d'IgM membranaire et une absence d'expression des récepteurs CD21 et CD23.
- les **B transitionnels de type 2 (T2)**, population intermédiaire entre les T1 et les cellules matures qui expriment IgD, CD21 et CD23 (marqueurs utilisés comme témoins d'activation des cellules B) (Rolink et al., 2004). Chez ces cellules, la transcription peut s'étendre jusqu'aux exons C δ situés en aval de C μ , ce qui leur permet d'exprimer IgM et/ou IgD de même région variable mais de région constante différente. La co-expression résulte de l'épissage alternatif du long transcrit des chaînes lourdes préservant soit les exons du gène constant μ (BCR IgM), soit ceux du gène δ (BCR IgD).

Lorsque les cellules B T2 rencontrent un antigène, elles se transforment en **cellules B matures**. S'il s'agit d'une stimulation « T-dépendante », l'antigène exogène est présenté à ces cellules par des lymphocytes T auxiliaires ou *helpers* (TH) et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules folliculaires dendritiques. Les cellules B matures qui reconnaissent l'antigène vont s'activer, perdre l'expression de leur Ig de surface et former des follicules lymphoïdes appelés aussi centres germinatifs (CG). Deux processus

supplémentaires de diversification du répertoire B vont s'effectuer dans ces structures : **l'hypermutation somatique** (ou SHM pour *Somatic HyperMutation*) et la **commutation isotypique** (ou CSR pour *Class Switch Recombination*). Ces deux évènements vont ainsi augmenter à la fois l'affinité du récepteur pour l'antigène et l'efficacité de la réponse antigénique. Les dernières étapes de la maturation vont conduire à la formation d'un pool de **cellules B mémoires** ou de **plasmocytes**.

Les **cellules B mémoires** constituent un groupe minoritaire à longue durée de vie (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles peuvent rapidement et efficacement présenter l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se transformer en plasmocytes.

Les **plasmocytes** sont des cellules effectrices qui produisent et sécrètent les anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme. En fonction de l'antigène et des signaux générés, ils peuvent être de longue durée de vie (plusieurs mois ou années) ou de courte durée de vie (de l'ordre de 2 semaines).

Certains antigènes sont capables d'induire une réponse directe des cellules B matures, on parle alors d'antigènes « T-indépendants ». Ils conduisent alors à la formation de B mémoires et plasmocytes à IgM de courte durée de vie et de faible affinité pour l'antigène.

II.2.2. Les recombinaisons secondaires

II.2.2.1. L'hypermutation somatique

Suite à une stimulation antigénique, on observe l'apparition de structures particulières appelés centres germinatifs (CG). Ces structures apparaissent quelques jours après l'exposition antigénique et persistent de quelques jours à quelques semaines. Les cellules stimulées vont alors perdre l'expression de leur Ig de surface et entrer dans une phase de prolifération massive (expansion clonale) : on parle alors de centroblastes. Ensuite, le CG se divise en une zone sombre contenant ces centroblastes et une zone claire composée de cellules au repos (les centrocytes).

Ce sont les cellules de la zone sombre qui sont la cible de l'hypermutation somatique. Des mutations ponctuelles, et parfois des insertions ou délétions, sont ainsi introduites dans la région variable et vont améliorer l'affinité du BCR (Odegard and Schatz, 2006). Les mutations sont le plus souvent localisées au niveau des régions dites CDR (régions hypervariables) qui forment le site de fixation antigénique (paratope), dans des motifs de

type RGYW (A/G G C/T A/T) ou WRCY (complémentaire de RGYW) pour 50 à 60% des mutations.

II.2.2.2. La commutation isotypique

La spécificité de la reconnaissance antigénique des Ig est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et légères. En revanche, les fonctions effectrices de ces Ig dépendent uniquement des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. La réponse immunitaire sera différente si l'antigène est rencontré pour la première fois par l'organisme (**réponse primaire**) ou si cette rencontre fait l'objet d'une réponse antérieure spécifique (**réponse secondaire**). Lors de la réponse primaire, ce sont principalement des IgM qui apparaissent ; la réponse est lente et courte. A l'issue de cette réaction, des cellules B mémoires sont créées et se réactivent lors d'une deuxième rencontre avec ce même antigène : c'est la réponse secondaire. Elle est caractérisée par une forte augmentation des autres isotypes (IgG dans la plupart des cas) qui réagissent plus rapidement et de manière plus efficace : c'est la commutation isotypique, encore appelée commutation ou recombinaison de classe, ou *switch* (**Figure 6**). Ce processus se révèle primordial pour accéder à une diversité fonctionnelle des réponses anticorps pour notre organisme.

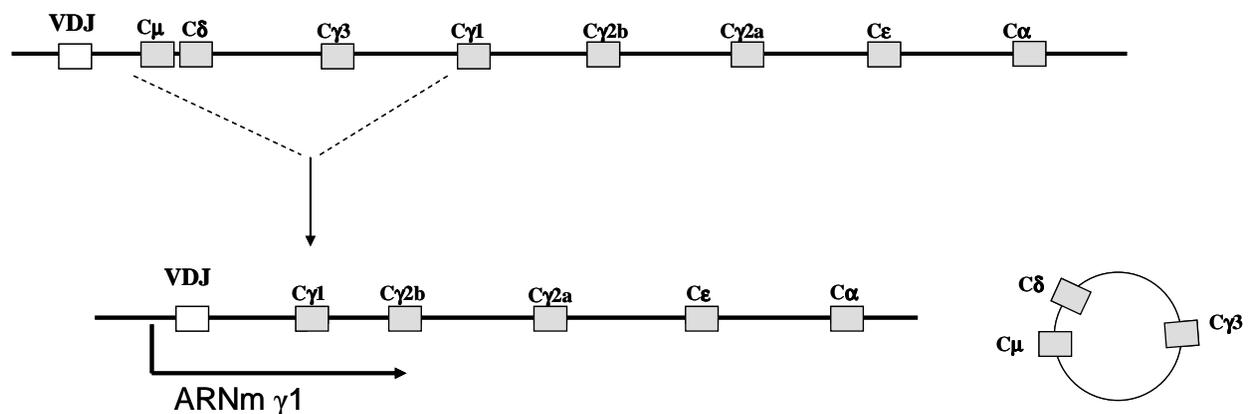


Figure 6 : Schéma représentant la commutation isotypique vers IgG1.

La région VDJ réarrangée est en blanc, les régions constantes en gris clair. La commutation isotypique rapproche le segment VDJ réarrangé d'un nouveau gène constant de classe différente de IgM (ici IgG1).

Dans la zone claire des centres germinatifs, les lymphocytes sont de plus petite taille et sont séparés par un large réseau de cellules folliculaires dendritiques (FDC). Ces lymphocytes ré-expriment leur Ig de surface : ce sont des centrocytes (**Figure 5**). C'est dans cette zone que s'effectue la commutation de classe. Ce phénomène rapproche le segment VDJ réarrangé d'un nouveau segment constant de classe différente d'IgM (IgG, IgA ou IgE). Pour tous les isotypes, il y a possibilité, par un épissage alternatif, de créer des formes membranaires ou sécrétées d'Ig.

La majorité des commutations vers les classes IgG, IgA et IgE dépend de la présence des lymphocytes T. L'IgG est l'isotype prédominant dans le sang et la lymphe. Les différentes sous-classes d'IgG possèdent des fonctions effectrices différentes dues à leurs capacités variables à lier les différents récepteurs Fc (FcγRI, FcγRII, FcγRIII et FcγRIV), à induire l'ADCC (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) et/ou à activer le complément (Nimmerjahn and Ravetch, 2005). IgG1 est l'isotype dominant dans la lutte contre les infections virales et parasitaires. La voie du complément n'est pas activée mais les IgG1 stimulent la phagocytose efficacement. Les IgG2a sont prédominantes dans les réponses antivirales. Elles peuvent activer le complément et sont particulièrement efficaces dans le rôle de médiateur de la cytotoxicité en liant les récepteurs Fc sur les macrophages. Les IgG3 jouent un rôle important dans la réponse antibactérienne et sont très efficaces dans la phagocytose.

Les IgA sont prédominantes dans les sécrétions (respiratoires, digestives ou génitales) et sont fortement résistantes à la protéolyse enzymatique.

Les IgE sont quant à elles impliquées dans la défense parasitaire, mais peuvent médier les réactions d'hypersensibilité. Les mastocytes et basophiles expriment des récepteurs de haute affinité pour IgE (FcεRI) qui peuvent lier les IgE monomériques en absence de l'antigène. Les antigènes spécifiques induisent l'agrégation des complexes IgE-FcεR entraînant la sécrétion d'histamine impliquée dans les réactions d'hypersensibilité.

II.2.3. Sélection clonale

A la sortie de la zone sombre, les centrocytes vont subir une double sélection qui vise à ne garder que les cellules exprimant des anticorps de haute affinité pour l'antigène (**Figure 5**). Les FDC jouent un rôle de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et peuvent retenir l'antigène plusieurs mois sous la forme de complexes immuns. Les centrocytes exprimant un récepteur de haute affinité pour les épitopes présentés par les FDC, sont sélectionnés

positivement et peuvent alors se différencier en cellules B mémoires ou en cellules plasmiques (cellules sécrétrices d'anticorps).

Les cellules exprimant des anticorps de faible affinité sont, quant à elles, éliminées par apoptose. Lors de cette étape de sélection, les anticorps auto-réactifs (dirigés contre le soi) pouvant être générés suite à l'hypermutation somatique sont, eux aussi, éliminés. Les mécanismes de sélection des cellules sont extrêmement stringents et font intervenir des interactions spécifiques avec les cellules T reconnaissant le même antigène. Les cellules ne recevant pas de signaux de la part des cellules T sont sélectionnées négativement et meurent par apoptose.

II.3. Mécanisme de recombinaisons secondaires

II.3.1. Rôle de AID dans la génération du répertoire secondaire

La découverte de la protéine AID (*Activation-Induced Deaminase*) a permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes d'hypermutation somatique et de recombinaison de classe (Muramatsu et al., 2007; Muramatsu et al., 1999; Ramiro et al., 2007). L'analyse de la séquence d'AID suggère que c'est une déaminase dont la structure se rapproche d'APOBEC-1 (enzyme d'édition d'ARN). Son expression est restreinte aux cellules B du centre germinatif. Le rôle d'AID a été découvert grâce à sa délétion dans des souris chez lesquelles il a été observé un développement B normal (expression d'IgM et d'IgD) avec un blocage complet du *switch* et de l'hypermutation somatique (Muramatsu et al., 2000). Chez l'homme, une déficience en AID entraîne le syndrome Hyper-IgM caractérisé par un taux élevé d'IgM, une absence d'IgG, d'IgA et d'IgE et une forte susceptibilité aux infections bactériennes (Revy et al., 2000).

De nombreuses équipes de recherche ont essayé de comprendre l'action d'AID. Du fait de la présence d'un motif cytidine-déaminase et d'une grande homologie avec APOBEC1, AID a tout d'abord été suspecté d'agir sur l'ARN. AID serait alors une nouvelle protéine d'édition d'ARN agissant sur les ARNm codant pour des endonucléases impliquées dans l'introduction de cassures d'ADN au cours de l'hypermutation (Muramatsu et al., 1999) (**Figure 7a**). Voici les arguments mettant en valeur ce modèle d'édition de l'ARN :

- APOBEC-1 et AID présentent 34% d'homologie de séquence ;
- APOBEC-1 et AID possèdent des domaines de localisation nucléaire (NLS) et d'exportation nucléaire (NES) importants pour la régulation de leur localisation dans la cellule ;

- la formation de dimère est une étape importante pour la fonction de ces deux protéines.

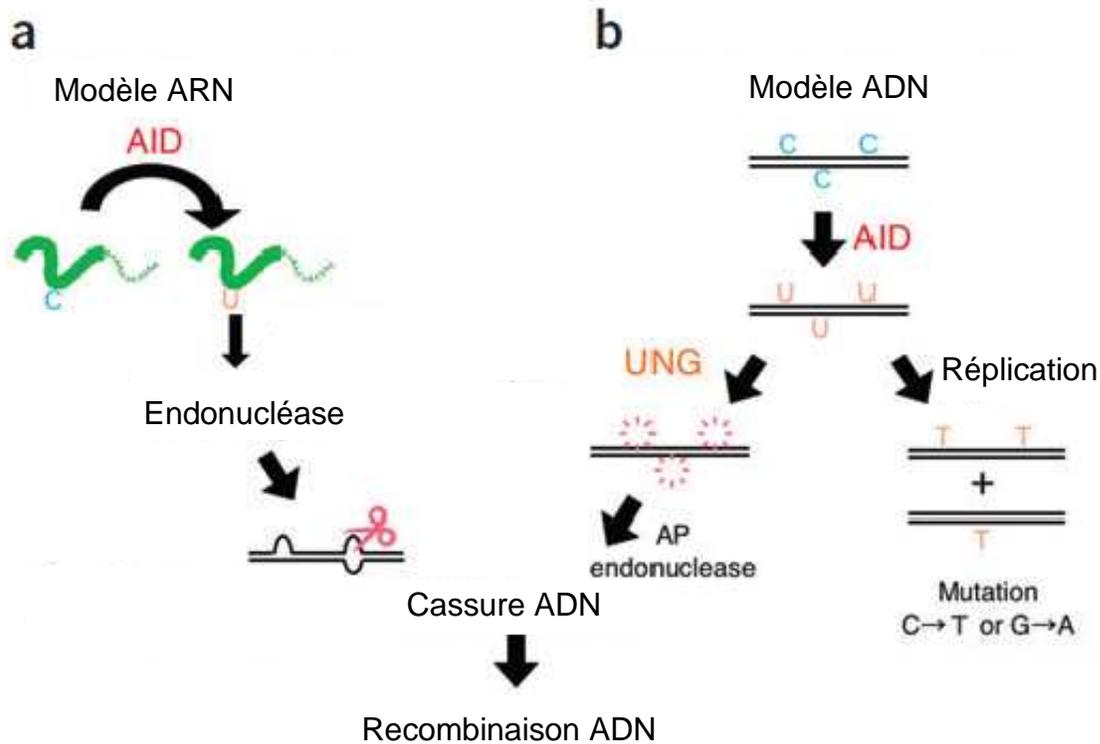


Figure 7 : Modèles d'action d'AID (d'après (Honjo et al., 2005)).

A. AID agit sur l'ARN en réalisant de l'édition d'ARN qui va alors coder pour une endonucléase qui va ensuite agir sur l'ADN.

B. AID agit sur l'ADN en déaminant directement les cytosines en uraciles ce qui provoque un mésappariement pouvant être reconnu et éliminé par l'UNG (Uracil-DNA glycosylase). Le site abasique créé est ensuite pris en charge par une endonucléase qui va couper l'ADN. L'uracile intégré peut également ne pas être reconnu et lors de la réplication, il y a apparition de mutations.

Pour ces deux modèles, la coupure de l'ADN active les voies de réparation comme la voie NHEJ (Non Homologous End Joining), la voie MMR (MisMatch Repair) notamment composées de polymérases infidèles.

Cependant, à l'heure actuelle, cette hypothèse d'action sur l'ARN est de plus en plus abandonnée. En effet des expériences récentes montrent qu'AID agit directement sur l'ADN. Selon ce modèle, AID entraînerait une déamination des cytosines (dC) en uraciles (dU) au niveau de l'ADN (Honjo et al., 2005; Neuberger et al., 2003) ce qui provoquerait un mésappariement de bases déclenchant l'alarme des différentes voies de réparation de l'ADN (**Figure 7b**). Le premier résultat mettant en avant l'ADN comme un substrat d'AID montre que l'expression d'AID dans *Escherichia coli* induit des mutations C vers T (Petersen-Mahrt

et al., 2002). AID peut se lier à l'ADN simple brin (ADNsb) ou à l'ARN mais peut seulement déaminer l'ADNsb (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003). Il a également été montré une préférence d'AID pour certaines séquences (Pham et al., 2003) et une association directe avec l'ADN dans des cellules stimulées (Nambu et al., 2003). APOBEC-1 peut également agir sur l'ADNsb mais de manière moins efficace (Petersen-Mahrt and Neuberger, 2003).

AID est principalement retrouvée dans le cytoplasme, son expression est liée à l'activation des cellules B. Il existe des facteurs protéiques aidant AID à cibler l'ADN. Son activité est augmentée après phosphorylation de la sérine 38 (S38) par la protéine PKA (*cAMP-dependent protein kinase A*) (Basu et al., 2005). Le remplacement de la sérine par une alanine (AID^{S38A}) conduit à une forte baisse de la commutation isotypique et de l'hypermutation (Basu et al., 2005). PKA est une kinase ubiquitaire et AID n'est pas uniquement phosphorylée dans les cellules B, puisque AID, exprimée dans les fibroblastes, est phosphorylée et que la mutation perturbe l'hypermutation dans ces cellules ((McBride et al., 2006). La phosphorylation d'AID l'active et facilite son interaction avec la protéine de réplication A (RPA) qui est une protéine de liaison à l'ADNsb (Basu et al., 2005; Chaudhuri et al., 2004). RPA cible ainsi l'activité d'AID phosphorylée vers l'ADNsb et pourrait favoriser son interaction avec UNG (*Uracil N Glycosylase*) impliquée dans les voies de réparation.

II.3.2. AID et l'hypermutation somatique

II.3.2.1. Recrutement de AID à la région variable

Le processus d'hypermutation somatique (SHM) débute systématiquement par une activation de la transcription dans les cellules B activées, ce qui rend accessible la région d'ADN d'intérêt (Chaudhuri et al., 2003; Peters and Storb, 1996; Pham et al., 2003; Ramiro et al., 2003) en créant des petites boucles de transcription avec l'ADNsb (**Figure 8a**). Ces cellules vont également exprimer AID qui, une fois phosphorylée, va interagir avec la protéine RPA. Le complexe RPA/AID va ensuite se fixer sur l'ADN en cours de transcription, cette fixation serait améliorée par les capacités de RPA et AID à se lier à la RNA polymérase II. RPA permet de stabiliser l'ADNsb pendant qu'AID joue son rôle de déaminase qui, lorsqu'elle a terminé, se détache du complexe. RPA reste liée à l'ADN et pourrait jouer un rôle par la suite dans le recrutement des protéines de réparation (Chaudhuri et al., 2004). La phosphorylation de AID est une étape importante pour le processus d'hypermutation (McBride et al., 2006).

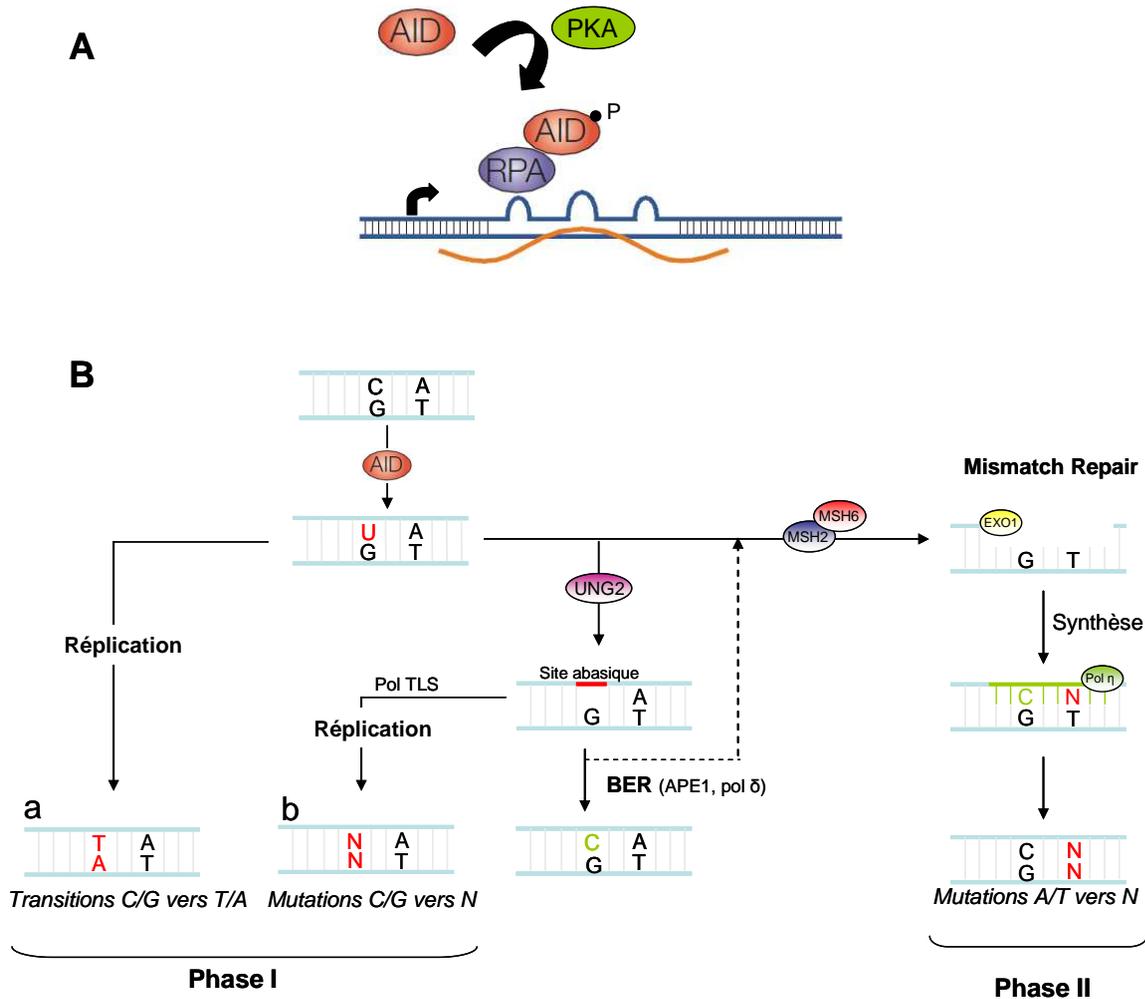


Figure 8 : Modèle d'hypermutation somatique.

A. Recrutement d'AID aux motifs RGYW.

Dans les cellules B activées, AID est exprimée et phosphorylée par PKA sur la sérine 38. Cette phosphorylation facilite l'interaction avec RPA qui est une protéine liée à l'ADN. AID ainsi liée à l'ADN peut agir sur les zones cibles en déaminant l'ADN (d'après (Chaudhuri and Alt, 2004)).

B. Présentation des différentes voies de réparation de l'ADN suite à l'action d'AID.

Le mismatch U/G provoqué par AID peut être pris en charge par différentes voies de réparation (BER : Base-Excision Repair ; MMR : MisMatch Repair) qui, dans le cas de l'hypermutation somatique, vont aboutir à des mutations de phase 1 (pour les paires C/G) ou de phase 2 (paires A/T). TLS : polymérases translésionnelles ; UNG2 : Uracil-DNA-Glycosylase 2.

Des études *in vitro* ont montré que le brin non matrice était préférentiellement la cible d'hypermutation (Pham et al., 2003; Ramiro et al., 2003) tandis que *in vivo*, les deux brins transcrit et non transcrit sont touchés ((Milstein et al., 1998; Rada et al., 2004; Shen and Storb, 2004; Shen et al., 2006; Xue et al., 2006). AID agit sur les cytosines inscrits dans des motifs WRCY (ou RGYW) qu'elle va alors transformer en uraciles (Fukita et al., 1998; Longerich et al., 2005; Rada et al., 2004; Shen et al., 2006; Xue et al., 2006). Il existe également des mutations sur les bases A:T avec une mutation préférentielle sur les A des motifs WA. Ces mutations dépendraient de l'action de la polymérase η (eta) qui est une polymérase infidèle et associée à la voie de réparation *MisMatch Repair pathway* (MMR) (Steele, 2009).

Des expériences ont permis de montrer que le domaine N-terminal d'AID était important pour le processus de SHM (Shinkura et al., 2004).

Il existe une forte corrélation entre la fréquence de mutation et le taux de transcription (Bachl et al., 2001). Lorsque le promoteur est absent, le taux de SHM est diminué (Fukita et al., 1998) alors que s'il est dupliqué en amont de la région constante, cette région se retrouve alors hypermutée (Peters and Storb, 1996). De plus, s'il est remplacé par un autre promoteur, l'hypermutation a quand même lieu car la transcription a été activée (Betz et al., 1994; Komori et al., 2006; Tumas-Brundage et al., 1997).

II.3.2.2. Réparation

L'uracile intégrée par AID n'étant pas un composant naturel de l'ADN, il doit donc être réparé. Les différents mécanismes de réplication et/ou réparation vont alors déterminer le devenir et le profil des mutations introduites (**Figure 8b**) (Di Noia and Neuberger, 2007; Neuberger, 2008) :

- 1- si la mutation est ignorée et considérée comme une thymine par les ADN polymerases répliquatives, il y a alors, dans une des molécules d'ADN-filles, une mutation de type transition C vers T (et G vers A) après réplication (phase Ia) ;
- 2- la mutation peut également être reconnue et éliminée par l'uracile-DNA-glycosylase 2 (UNG2), ce qui crée un site abasique. Ce dernier peut être répliqué suite à l'intervention d'une polymérase translésionnelle, qui insérera un dNTP en regard, obtenant ainsi des mutations de type transition et tranversion (C/G vers N) (phase Ib). La lésion constituée par le site abasique peut également être la cible de la voie de réparation BER (*Base-Excision Repair*) qui, en principe, n'est pas *error-prone* et restaure le C originel ;
- 3- le mésappariement peut également être pris en charge par le système MMR en étant reconnu par l'hétérodimère MSH2-MSH6. Séquentiellement, les protéines Mlh1,

Pms2 sont recrutées sur le site pour effectuer une cassure simple brin, l'exonucléase EXO1 excise ensuite le mésappariement (et potentiellement les bases environnantes). L'homotrimère PCNA recrute ensuite des polymérase infidèles qui génèrent des erreurs dans la réparation de l'ADN. Dans le cadre de l'hypermutation somatique, cette synthèse par la polymérase η aboutit à l'apparition de mutations sur les paires A/T (A/T vers N) (phase II).

II.3.3. AID et la commutation isotypique

II.3.3.1. Facteurs importants pour le *switch*

- La transcription germinale

Le phénomène de commutation de classe est, comme pour l'hypermutation somatique, associé à une transcription préalable. Il s'agit d'une transcription germinale c'est-à-dire qu'aucune protéine n'est produite et a plutôt pour but de rendre la région accessible (Nambu et al., 2003) (**Figure 9**). Chaque exon CH1 de la région constante de chaque isotype (sauf pour δ) est précédé d'un exon I (non traduit) et d'une région répétée, dite région *switch* (S). De nombreux signaux cytokiniques transmis notamment par les cellules T activent le promoteur I, ce qui initie la transcription qui se poursuit à travers l'exon I, la région S et les différents exons constants CH, jusqu'au site de polyadénylation (Dudley et al., 2005). En 2001, Lee et al. montrent que le niveau d'expression des transcrits germinaux corrèle avec l'efficacité du *switch* (Lee et al., 2001). L'importance des promoteurs germinaux et des exons I a été plusieurs fois démontrée : la suppression des exons I α (autres que I μ) par recombinaison homologue chez la souris, induit un blocage de la transcription germinale du gène constant x correspondant, suivi d'une perte complète de la recombinaison vers l'isotype X (Bottaro et al., 1994; Jung et al., 1993; Zhang et al., 1993). La suppression de I μ réduit seulement le phénomène (Kuzin et al., 2000).

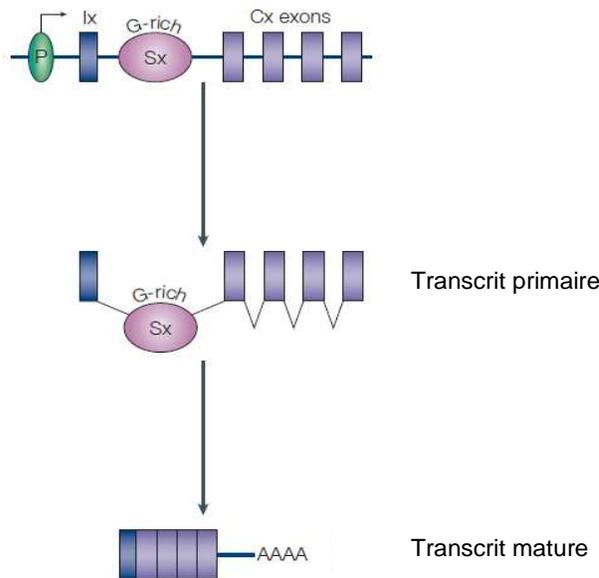


Figure 9 : Schéma de la transcription germinale lors de la commutation isotypique (Chaudhuri and Alt, 2004).

Le transcrit primaire subit un épissage alternatif et devient alors mature. Par contre il n'y a pas production de protéine.

- Les régions *switch* (S)

Ce sont les régions cibles pour la commutation isotypique. Elles sont constituées de motifs répétés riches en G et C, sont situées en 5' de chaque gène constant (sauf pour C δ). Les régions S ont une taille variant de 1 kb (S ϵ) à 10 kb (S γ 1). Les séquences S μ , S ϵ et S α sont composées de pentamères tels que GGGGT, GAGCT et GGGCT. La région S γ contient également ces éléments mais se distingue par la longueur de ces segments répétés (Dunnick et al., 1993). Contrairement aux régions VDJ, la recombinaison ne s'effectue pas au niveau de sites spécifiques mais plutôt dans différents sites localisés dans les régions S. Des cassures à la fois double et simple brin seraient impliquées dans l'initiation de la commutation isotypique (Chen et al., 2001). De fréquentes mutations sont retrouvées au voisinage des points de cassure (Kenter, 2003; Manis et al., 2002). Bien qu'ayant des tailles et séquences variables, les régions S peuvent se substituer les unes aux autres : ainsi le remplacement de S γ 1 par S γ 3 induit toujours une commutation de classe vers IgG1 (Zarrin et al., 2008). Lorsque l'on supprime S μ chez la souris, le phénomène de recombinaison de classe est réduit de 12 à 50% (Khamlichi et al., 2004; Luby et al., 2001) alors que la délétion de S γ 1 inhibe uniquement la commutation vers IgG1 (Shinkura et al., 2003).

La modification des histones au niveau des régions S joue un rôle important lors du *switch*. En effet, une des premières étapes est de rendre cette région accessible. Pour cela, il va y avoir une acétylation des histones rendant accessibles uniquement les régions S (les régions constantes en aval restent hypoacétylées). La RNA polymérase II est aussi présente pour faciliter cette accessibilité. Le niveau d'acétylation des régions S détermine la fréquence de recombinaison : plus la région est accessible, plus le *switch* se produira vers l'isotype correspondant (Wang et al., 2009).

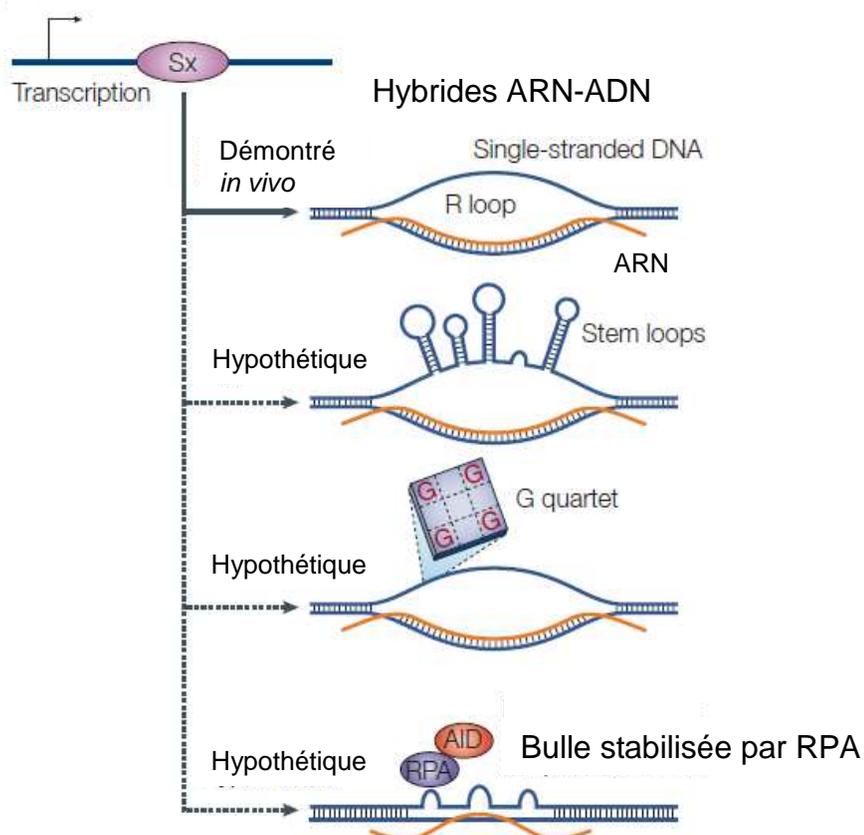


Figure 10 : Différents modèles de structure secondaire des régions S (Chaudhuri and Alt, 2004).

Les transcrits des régions S s'associent de manière stable avec le brin matrice de l'ADN pour former un hybride ARN-ADN. Le brin non-matrice se retrouve alors sous forme simple brin et peut adopter différentes structures.

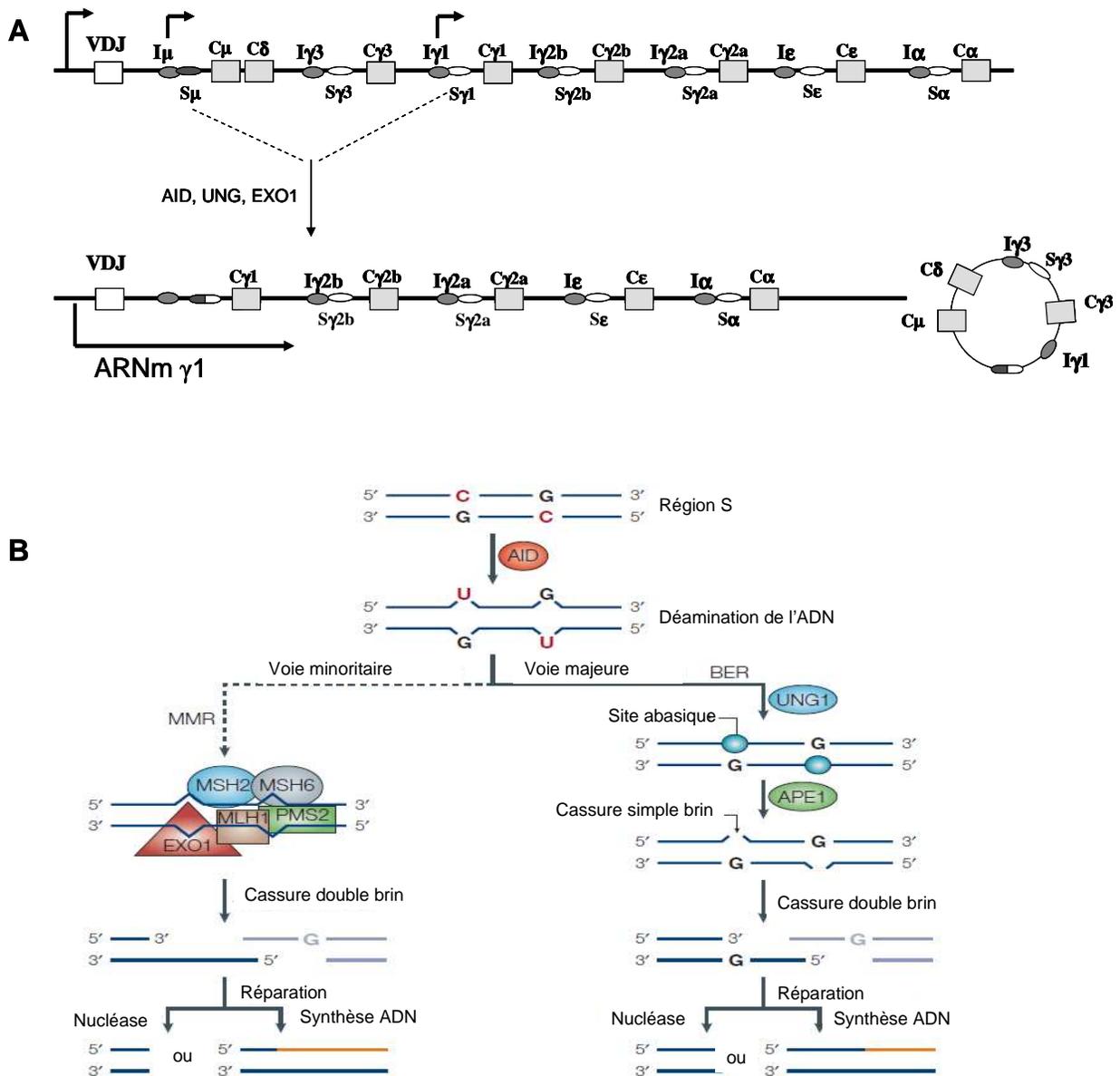


Figure 11 : Mécanisme de recombinaison de classe (Chaudhuri and Alt, 2004).

A. Schéma représentant la commutation isotypique vers IgG1.

La région VDJ réarrangée est en blanc, les régions constantes en gris clair. La région S_{μ} est en noir, les régions S_x en blanc. Les transcriptions germinales à partir de I_{μ} et $I_{\gamma 1}$ sont représentées par des flèches coudées.

B. Mécanisme de réparation suite à l'action d'AID.

II.3.3.2. Modèle de recombinaison de classe

La transcription germinale activée aboutit à la formation de structures particulières au niveau de l'ADN qui seraient la cible de AID pour initier le clivage de l'ADN et déclencher la commutation de classe (Chaudhuri and Alt, 2004). Il semblerait que ce soit la structure secondaire des régions S qui soit importante pour le *switch* et non la séquence (Chen et al., 2001; Tashiro et al., 2001). Les transcrits des régions S peuvent s'associer de façon stable au brin d'ADN matrice pour former des hybrides ARN-ADN dans lesquels le brin non-matrice peut adopter différentes structures (**Figure 10**) : les quartets G (Dempsey et al., 1999), les stem-loops (Tashiro et al., 2001), la boucle R (Yu et al., 2003) et la bulle stabilisée par RPA (Chaudhuri et al., 2004). Seul le modèle de la boucle R simple brin a été démontré *in vivo* (Yu et al., 2003). Comme pour l'hypermutation somatique, AID semble initier le processus de *switch* en déaminant les cytosines dans les régions S (Chaudhuri and Alt, 2004). Ces régions riches en G et C correspondent à des points chauds (*hot spots*) de déamination comparables à ceux de l'hypermutation somatique. Par contre, c'est la partie C-terminale d'AID qui serait importante pour ce processus (Barreto et al., 2003; Ta et al., 2003). Suite à l'action d'AID dans ces régions S, UNG élimine l'uracile entraînant la formation d'un site abasique (**Figure 11**). Comme pour l'hypermutation somatique, la phosphorylation d'AID est importante (McBride et al., 2008). Les complexes de réparation/excision de la voie BER ou de disparité MMR génèrent des cassures simple puis double brin (Catalan et al., 2003; Petersen et al., 2001; Wuerffel et al., 1997). Puis l'histone H2AX, élément critique du recrutement des facteurs du NHEJ sur le site double brin (Paull et al., 2000), agit sur les cassures créées par AID (Petersen et al., 2001) en formant une synapse entre les régions S clivées. Les données actuelles suggèrent que les jonctions des régions S sont assurées par les composants de la voie NHEJ. Les facteurs Ku70 et Ku80 ont été décrits comme éléments indispensables pour le *switch* (Casellas et al., 1998; Manis et al., 1998a). Chez la souris, une mutation de DNA-PKcs provoque un blocage complet du développement B en l'absence d'Ig transgénique et une diminution du *switch* vers tous les isotypes (sauf IgG1) (Manis et al., 2002). Une mutation Y288C au niveau de la protéine Ligase IV entraîne un arrêt du développement B et du *switch* (Nijnik et al., 2009). Cependant, des souris déficientes pour *Xrcc4* ont des taux de commutation isotypique normaux, ce qui indique qu'une voie NHEJ « non classique », indépendante de XRCC4 et Lig IV, existe. Cette voie, capable de suppléer la voie NHEJ classique, génère des domaines de microhomologie au site de jonction des régions S impliquées (Yan et al., 2007a). Ceci a été confirmé en 2009 par la délétion conditionnelle de Artemis dans les cellules B matures de souris qui présentent alors une réduction du *switch* pour certains isotypes (IgG3 et IgA) (Rivera-Munoz et al., 2009).

Aussi, il a été montré un rôle des protéines RNF8 et RNF168 dans le recrutement de 53BP1 (impliquée dans le processus de ligature) au site endommagé (Ramachandran et al., 2010). Une étude dans des cellules CH12F3-2, connues pour *switcher* fortement vers IgA, ne peut le faire uniquement si ces trois protéines sont présentes (Ramachandran et al., 2010).

II.3.3.3. Cytokines impliquées dans le *switch*

Différents modèles d'études ont mis en évidence le contrôle de la production des différents isotopes par les cytokines (Stavnezer, 2000). L'ajout de lipopolysaccharide (LPS) seul active l'expression d'IgG2b et IgG3. L'interleukine 4 (IL-4) ajoutée à des cellules B activées par le LPS conduit à une commutation de classe vers IgG1 et IgE, alors que l'interféron- γ (IFN- γ) induit une commutation vers IgG2a. Le *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) quant à lui stimule la commutation vers IgA. Toutes ces cytokines sont principalement produites lors d'une réponse « T-dépendante » par les lymphocytes T. Les lymphocytes B activés de manière polyclonale par le LPS, ou spécifiquement par un antigène, vont présenter ce dernier aux lymphocytes T qui, selon le type d'antigène, vont sécréter une cytokine particulière qui stimulera la production d'une classe d'Ig chez ces lymphocytes B. Les lymphocytes B jouent alors le rôle de cellules présentatrices d'antigène (CPA). La coopération T/B est renforcée par la production de molécules CD40-L par les lymphocytes T qui vont améliorer la liaison T/B et le signal de commutation vers la majorité des isotopes. L'action des cytokines semble s'exercer essentiellement au niveau des promoteurs germinaux. Les cytokines induiraient la production de plusieurs facteurs de transcription qui, après avoir formé un complexe, se fixeraient au niveaux de ces promoteurs (Delphin and Stavnezer, 1995; Stavnezer, 1995; Warren and Berton, 1995).

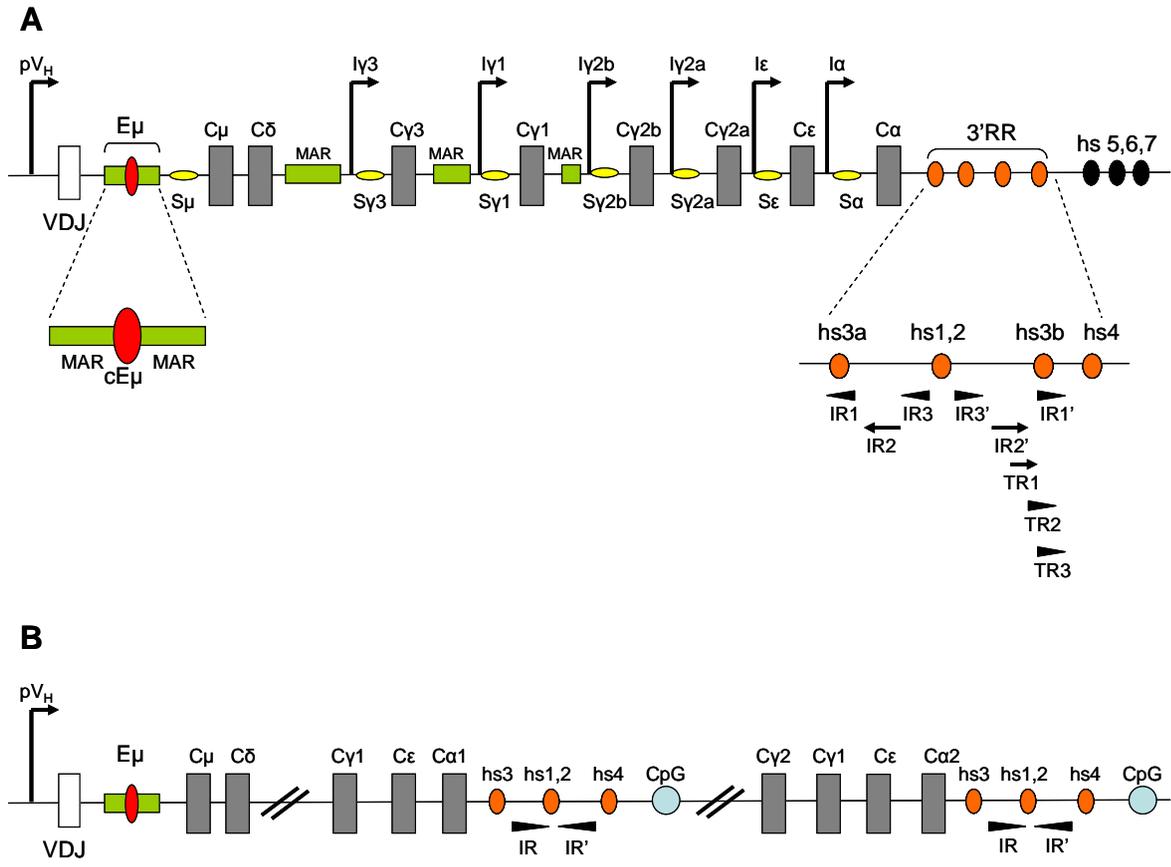


Figure 12 : Structure des loci IgH chez la souris et l'homme.

La région variable VDJ réarrangée est représentée par un rectangle blanc, les gènes constants par des rectangles gris. L'activateur $E\mu$ est en rouge et la région régulatrice 3'RR en orange. Les rectangles verts sont les régions d'ancrage à la matrice (MAR). Les régions répétées en tandem (TR) et répétées inversées (IR) sont positionnées en 3' du gène $C\alpha$.

A : Locus murin.

Les ellipses jaunes représentent les régions S. Les promoteurs germinaux sont signalés par des flèches coudées.

B : Locus humain.

Les régions 3' des gènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ contiennent des activateurs et des régions riches en G/C (ellipses bleues).

III. LA REGULATION DES GENES DU LOCUS IGH

III.1. Les promoteurs

III.1.1. Les promoteurs pV_H

Les promoteurs des gènes de chaînes lourdes se situent en amont de chaque région variable V et assurent un niveau basal de transcription (**Figure 12A**). Ils se situent dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'ensemble des promoteurs possède une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box : ATGCAAAT (Parslow et al., 1984). Des études de transfections stables (Dreyfus et al., 1987; Mason et al., 1985; Wirth et al., 1987) et de transgénèse chez la souris (Jenuwein and Grosschedl, 1991) ont montré que la spécificité cellulaire des promoteurs d'Ig pouvait en partie être expliquée par la présence des séquences octamériques. Ces séquences sont reconnues par des facteurs de transcription de la famille Oct, Oct-1 et Oct-2. Ces deux protéines activent efficacement la transcription uniquement dans la lignée B à partir d'un promoteur d'Ig (LeBowitz et al., 1988; Pfisterer et al., 1994; Pierani et al., 1990).

En plus de l'octamère, les promoteurs pV_H contiennent une séquence heptamérique. En association avec l'octamère, cette séquence permet une activation spécifique et optimale du promoteur (Eaton and Calame, 1987).

III.1.2. Le promoteur/activateur DQ52

DQ52 est l'un des douze segments de gènes D appartenant au locus IgH, préférentiellement utilisé lors des réarrangements DJ (Tsukada et al., 1990). Il s'agit du seul segment D transcrit bien avant la survenue des premiers réarrangements V(D)J (Alessandrini and Desiderio, 1991; Li et al., 1996). Les transcrits germinaux μ_0 sont considérés comme l'un des indicateurs les plus précoces de l'engagement vers la lignée B (Li et al., 1996). Cette transcription serait nécessaire pour l'accessibilité de la région D-J pour la recombinaison (Thompson et al., 1995). L'activateur situé en 5' de DQ52 a été caractérisé par Kohler en 1994 (Kottmann et al., 1994). Il s'agit d'un promoteur-activateur synergique de $E\mu$. Les résultats obtenus après délétion de cet activateur chez la souris montrent une altération dans l'utilisation des segments J_H les plus éloignés de DQ52 (J_{H3} et J_{H4}). Cependant, cette délétion n'inhibe pas le réarrangement DJ_H et ne bloque pas la transcription μ_0 (Nitschke et al., 2001). La délétion conjointe de cet élément avec $E\mu$ a révélé que DQ52 n'était pas requis pour le réarrangement DJ_H et pour la transcription μ_0 (Afshar et

al., 2006). D'autres éléments de contrôle semblent donc nécessaires pour réguler ces évènements.

III.1.3. Les promoteurs I

Des promoteurs ont également été décrits en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig, à l'exception de C δ (**Figure 12A**). Ce sont les sites d'initiation de la transcription germinale qui précèdent les évènements de *switch* (Xu and Stavnezer, 1992). Ce type de transcription a pour but de rendre accessibles les régions d'intérêt.

Afin de rendre encore plus accessibles les différentes régions lors des recombinaisons géniques, en plus des transcrits sens, des transcrits antisens ont été mis en évidence (Perlot et al., 2008).

III.2. L'activateur intronique E μ

E μ fut le premier activateur découvert au niveau du locus IgH. Il est localisé dans l'intron entre le segment J_{H4} et le gène C μ (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983). Il est formé d'un activateur central ou « core » cE μ , entouré par deux régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR, « Matrix Attachment Region »). Sa localisation en amont de S μ lui permet d'être préservé de tous les évènements de recombinaison se produisant dans ce locus (**Figure 12A**). E μ est actif tout au long du développement B avec un maximum d'activité aux stades précoces, ce qui suggère un rôle de cet élément lors des recombinaisons V(D)J (**Figure 13**).

E μ fixe de nombreux facteurs comme Oct-1 et Oct-2 et contient notamment les sites μ E5 (Ernst and Smale, 1995).

Le rôle de E μ a été étudié grâce à des expériences de *knock-out* (KO) du core E μ (cE μ) ou des régions MAR. Le remplacement de cE μ par un oligonucléotide ou son élimination dans des souris chimériques, entraîne une diminution mais pas de blocage des réarrangements V(D)J (Sakai et al., 1999; Serwe and Sablitzky, 1993). La diminution des réarrangements DJ est modérée alors que les réarrangements V-DJ sont fortement affectés. Cette étude suggère l'action synergique d'un autre élément avec E μ sur ces recombinaisons. De plus, la délétion des régions MAR n'a pas révélé de phénotype remarquable (Sakai et al., 1999). Chez les animaux KO pour cE μ , on assiste à un blocage partiel du développement B au stade pro-B causé par une sévère diminution des réarrangements D vers J et V vers DJ

(Afshar et al., 2006; Perlot et al., 2005). Ce phénotype peut s'expliquer par le fait que $E\mu$ contrôle localement l'accessibilité de la chromatine. En effet, en absence de $E\mu$, on observe une réduction de l'acétylation des histones H3K9 (chromatine active) et une méthylation des H3K9 non affectée (chromatine inactive) (Chakraborty et al., 2009). Ces expériences ont également montré le rôle activateur de $cE\mu$ sur la transcription germinale sens $\mu 0$ initiée en amont de DQ52 (Perlot et al., 2005) et d'autre part la transcription germinale initiée en 3' (Afshar et al., 2006). Cette baisse de transcription est directement corrélée à une faible détection de RNA polymérase II au niveau de la chromatine. $E\mu$ joue donc également un rôle dans le recrutement de cette enzyme au niveau du locus IgH (Chakraborty et al., 2009). Cependant, aux stades B matures, $E\mu$ ne semble pas exercer un rôle important puisque sa délétion diminue mais n'abolit pas le *switch* (Bottaro et al., 1998; Perlot et al., 2005) et n'a aucun effet sur l'hypermutation somatique (Perlot et al., 2005).

Le rôle des MAR n'est pas encore élucidé. Ces régions seraient impliquées dans l'interaction avec le facteur de transcription spécifique du locus IgH Bright (« B cell Regulator of IgH Transcription ») ce qui rendrait les régions environnantes accessibles et activerait $E\mu$ (Kaplan et al., 2001; Zong et al., 2000).

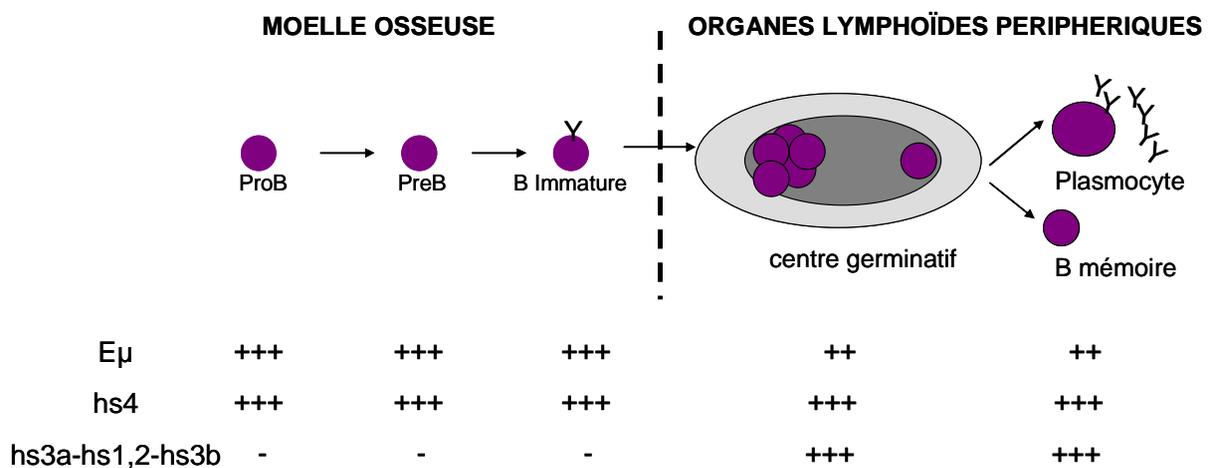


Figure 13 : Activité de $E\mu$ et de la région régulatrice 3'RR lors du développement B
 L'activateur intronique $E\mu$ est actif pendant tout le développement B mais son activité est maximale aux stades B précoces dans la moelle osseuse, d'où sa forte implication dans les recombinaisons V(D)J. Hs4 est le seul élément de la région 3'RR à être actif tout au long du développement B. Le palindrome est quant à lui actif uniquement aux stades B tardifs de la maturation (B matures et plasmocytes).

III.3. La région régulatrice située en 3'RR du locus IgH

III.3.1. Historique

De part son expression tissu-spécifique, E μ a longtemps été considéré comme l'élément majeur de régulation du locus IgH. Cependant, dans certaines lignées cellulaires, la délétion spontanée de cet activateur n'affecte pas le taux d'Ig (Aguilera et al., 1985; Klein et al., 1984; Wabl and Burrows, 1984; Zaller and Eckhardt, 1985). De plus, certaines translocations chromosomiques rapprochant l'oncogène *c-myc* du gène C γ 2b, induisent une forte expression de *c-myc* même si la translocation entraîne la disparition de E μ (Neuberger and Calabi, 1983). D'autres éléments régulateurs de la transcription seraient alors présents au niveau du locus IgH pour expliquer ce phénomène. Quelques années plus tard, une lignée cellulaire présentant une délétion d'environ 4 kb immédiatement en 3' de C α et manifestant une diminution de la transcription, a permis de cibler une région comme étant une candidate potentielle pour contenir des éléments *cis*-régulateurs activant la transcription ou *enhancers* (Gregor and Morrison, 1986).

L'étude de la région 3' du locus IgH, chez le rat, a permis alors de découvrir un *enhancer* supplémentaire situé 25 kb en aval de C α . Son action est B spécifique (Pettersson et al., 1990). Son équivalent chez la souris (3' α E) a été découvert 16 kb en aval de C α 1 (Dariavach et al., 1991; Lieberon et al., 1991). Ces deux éléments présentent 82% d'homologie et sont entourés de séquences répétées inversées.

Un second *enhancer* (C α 3'E) a par la suite été identifié, situé à seulement 2 kb du gène C α chez la souris (Matthias and Baltimore, 1993).

L'étude de la présence de sites d'hypersensibilité à la DNase I a permis de mettre en évidence deux sites dans l'élément 3' α E, appelés hs1 et hs2 (Giannini et al., 1993). Grâce à cette technique deux autres sites ont été découverts : hs3 et hs4 qui sont respectivement à 29 et 33 kb de C α (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

Comme pour E μ , il existe dans cette région plusieurs motifs de liaison à des facteurs de transcription comme des sites octamériques Oct-1 et Oct-2, des motifs μ E5 ou de la famille AP (Grant et al., 1992; Matthias and Baltimore, 1993; Pettersson et al., 1990)

Nous avons maintenant pour habitude d'utiliser la nomenclature proposée par Saleque et al. qui est la suivante : de 5' en 3', C α 3'E correspond à hs3a, 3' α E à hs1,2, hs3 à hs3b et hs4 à hs4 (Saleque et al., 1997) (**Figure 12A**).

D'autres éléments hs ont été identifiés en aval de hs4 : hs5, hs6 et hs7. Ces trois sites ne présentent pas de rôle *enhancer* et sembleraient plus jouer un rôle d'isolateurs de la chromatine par l'intermédiaire de leur domaine de fixation aux facteurs CTCF (Garrett et al., 2005). L'étude de la région 5'IgH (en amont des gènes V) a permis de mettre en évidence la présence de 3 sites hypersensibles à la DNase I : hs1, hs2 et hs3 (Pawlitzy et al., 2006). Hs1 est actif uniquement au stade pro-B tandis que hs2 et hs3 sont actifs tout au long du développement B. L'activité de ces éléments a été testée et la combinaison hs1-2-3 entraîne une diminution de la transcription du gène rapporteur associé (Pawlitzy et al., 2006).

Une analyse plus approfondie par séquençage de toute cette région a montré que les trois premiers éléments (hs3a, hs1,2 et hs3b) forment un palindrome de plus de 20 kb, dont le centre est constitué par hs1,2 avec de part et d'autres des régions répétées inversées (Chauveau and Cogne, 1996; Saleque et al., 1997) (**Figure 12A**). Les extrémités de ce palindrome sont formées par les éléments hs3a et hs3b qui présentent 97 % d'homologie de séquences mais qui sont orientés de manière inverse (Saleque et al., 1997).

Chez l'homme, les gènes constants sont dupliqués en deux blocs, séparés d'environ 35 kb. Trois éléments hs similaires à ceux trouvés chez la souris ont été mis en évidence et sont retrouvés en aval de chaque gène α (**Figure 12B**). Il s'agit de hs3, hs1,2 et hs4 (Chen and Birshtein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Hs1,2 est, là aussi, entouré de régions répétées inversées d'environ 2 kb. Hs3b n'est pas présent chez l'homme. Il existe un polymorphisme complexe uniquement pour hs1,2 (Denizot et al., 2001; Guglielmi et al., 2004; Pinaud et al., 1997).

III.3.2. Activité de cette région 3'

Des études *in vitro* de transfections dans des lignées cellulaires ont montré que l'élément hs1,2 (du rat ou de souris) possède une activité aux stades B tardifs avec une activité maximale au stade plasmocytaire (Dariavach et al., 1991; Lieberon et al., 1991; Pettersson et al., 1990). Néanmoins, son activité est plus faible que $E\mu$ (25% de l'activité de $E\mu$). Hs3a et hs3b ont une faible activité (5 à 15% de l'activité de $E\mu$) dans les cellules B matures et dans les plasmocytes (Madisen and Groudine, 1994; Matthias and Baltimore, 1993). En résumé les éléments faisant partie du palindrome possèdent une activité seulement dans les cellules B aux stades tardifs du développement. Les mêmes études réalisées pour hs4 ont, à l'opposé, montré que cet élément était actif dès le stade pro-B jusqu'au stade plasmocytaire (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995) (**Figure 13**).

L'étude du rôle de ces éléments humains 3' a été réalisée en utilisant différentes lignées cellulaires, correspondant aux différents stades de développement B (Hu et al., 2000). Il a été montré que l'élément hs1,2 augmente fortement l'activité des promoteurs $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans les cellules B matures. Par contre hs3 et hs4 seuls n'ont pas, voire peu, d'activité. Comme chez la souris, l'activité maximale est obtenue en présence des trois éléments hs (Hu et al., 2000).

Ces profils d'expression corrént assez bien avec le profil de méthylation de cette région 3' : la région est hyperméthylée aux stades B précoces et se déméthyle au cours de l'ontogénie B jusqu'au stade plasmocytaire (Giannini et al., 1993). Il apparaît cependant que hs4 ainsi que les sites hs5, hs6 et hs7 (non décrits comme ayant une activité transcriptionnelle quelconque) sont non méthylés tout au long du développement B et que seule la région palindromique comprenant hs3a, hs1,2 et hs3b subit une déméthylation progressive (Giambra et al., 2008). Cette étude complète celle réalisée quelques années auparavant par le groupe de Birshstein qui montrait une acétylation progressive de la région 3' tout au long du développement B (Garrett et al., 2005).

III.3.3. Synergie entre les éléments 3' du locus IgH

La répartition et la multiplicité des *enhancers* 3' du locus IgH laissent penser que ceux-ci pourraient agir de façon concertée pour activer la transcription. L'idée de synergie entre les différents éléments est venue de l'analyse de cellules plasmocytaires transfectées avec un vecteur contenant un gène μ réarrangé, placé sous le contrôle d'un promoteur pV_H, avec E μ et/ou hs1,2. Il a été montré que la présence de hs1,2 (en plus de E μ) permet d'augmenter la transcription d'un facteur 6 (Mocikat et al., 1993). De plus, cet effet est fortement dépendant de la distance séparant E μ et hs1-2, puisque la juxtaposition de ces deux éléments annule tout effet activateur (Mocikat et al., 1995), alors que si hs1,2 est placé en aval des gènes constants, l'activité transcriptionnelle est importante (Mocikat et al., 1993). De plus, l'effet stimulateur est augmenté si la distance entre les gènes constants et hs1,2 est grande, donc lorsque la distance entre E μ et hs1,2 est importante (Mocikat et al., 1993; Mocikat et al., 1995). Après la découverte de hs3b et hs4, Madisen et Groudine ont étudié l'effet d'une combinaison des quatre hs sur la transcription d'un gène rapporteur. Pris séparément, les différents éléments activent faiblement la transcription. Par contre, différentes combinaisons de ces éléments augmentent la transcription, avec un effet maximal lorsqu'ils sont tous présents (Madisen and Groudine, 1994).

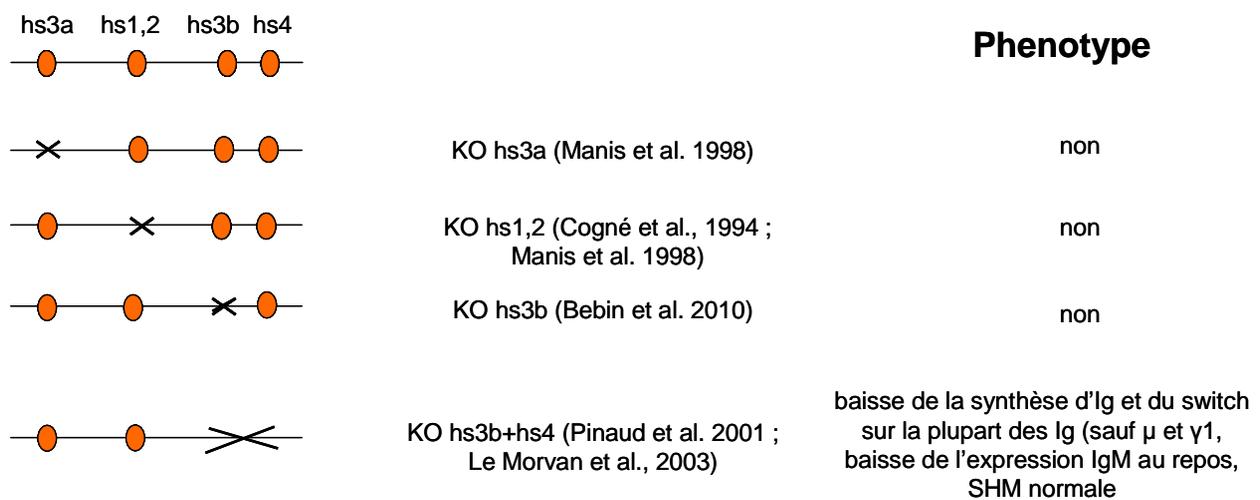


Figure 14 : Etude du rôle de la région régulatrice 3'RR par knock-out (KO) chez la souris.

Les croix représentent les éléments supprimés lors des différents modèles de KO.

La coopération entre $E\mu$ et les éléments de la région 3' est différente en fonction des combinaisons réalisées. Pris séparément, les éléments 3' n'augmentent pas significativement l'effet de $E\mu$. Par contre, la combinaison de plusieurs de ces éléments devient un puissant co-activateur de $E\mu$, en particulier lorsque la configuration de la région est respectée. Cette synergie est dépendante du stade de développement B étudié. En effet, lors du stade pré-B, la région 3'RR possède très peu d'activité, il n'y a donc pas de synergie avec $E\mu$. Par contre, aux stades B matures, la région 3'RR étant active, le palindrome stimule efficacement la transcription et une activité maximale est obtenue lorsque *hs4* est présent. L'effet maximal est obtenu en présence de $E\mu$ et de toute la région 3' (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998).

III.3.4. Rôles de la région 3'RR dans le développement B

III.3.4.1. La région 3'RR et les recombinaisons secondaires

Du fait de son activité tardive, la région 3'RR serait plus importante aux stades finaux du développement B. De nombreuses études de *knock-out* (KO) chez la souris ont permis de préciser un peu plus son action sur les processus de recombinaisons secondaires, à savoir l'hypermutation somatique et la commutation isotypique.

Le premier modèle de souris réalisé a consisté au remplacement de l'élément *hs1,2* par le gène de résistance à la néomycine sous contrôle du promoteur *pgk* (*pgk-neo^r*) (Cogne et al., 1994; Manis et al., 1998b). Son remplacement n'affecte pas les recombinaisons V(D)J mais altère la commutation isotypique sur tous les isotypes sauf $\gamma 1$. Cette baisse de *switch* est liée à une baisse initiale de la transcription germinale des gènes constants correspondants. *In vivo*, seule la synthèse d'IgG3 et IgG2b est diminuée. Les isotypes IgM et IgG1 ne sont pas affectés.

Un phénotype similaire a été observé en remplaçant *hs3a* par la cassette *pgk-neo^r* (Manis et al., 1998b). Cependant, lorsque cette cassette de résistance est éliminée dans les souris KO pour *hs3a* ou *hs1,2*, suite à l'action de la recombinaison *cre*, ces souris retrouvent un phénotype sauvage (Manis et al., 1998b) (**Figure 14**). La délétion seule de *hs3a* ou de *hs1,2* n'a alors aucun effet sur le développement B de ces souris. Ces deux éléments ne semblent donc pas essentiels pour la commutation isotypique. De plus, il a été montré dans des lignées cellulaires, que *hs1,2* n'avait pas de rôle dans le processus d'hypermutation somatique (Tumas-Brundage et al., 1997).

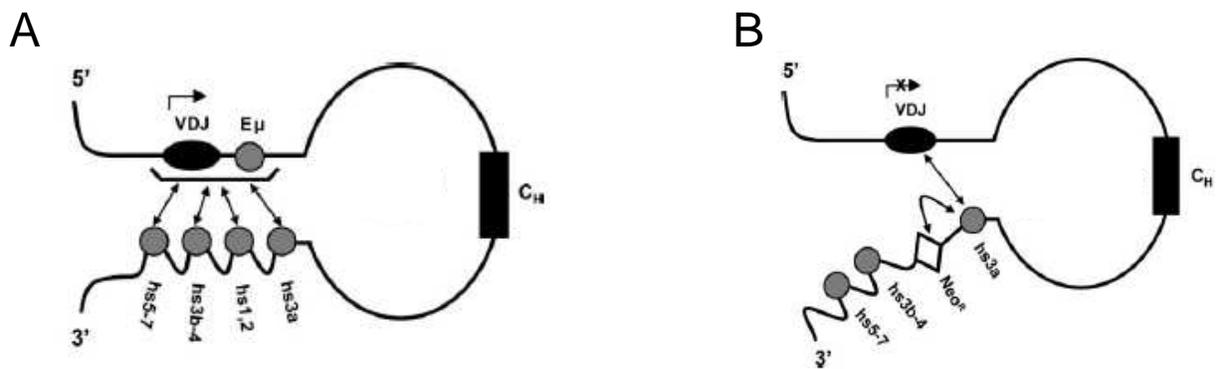


Figure 15 : Modèle d'interaction physique entre l'élément $E\mu$ et la région 3'RR (d'après (Ju et al., 2007)).

A. La région 3'RR interagit physiquement avec $E\mu$ et la région variable.

B. L'ajout du gène neo^R à la place de $hs1,2$ empêche les éléments situés en aval d'interagir avec la région variable, $hs3a$ étant le seul élément lié à celle-ci.

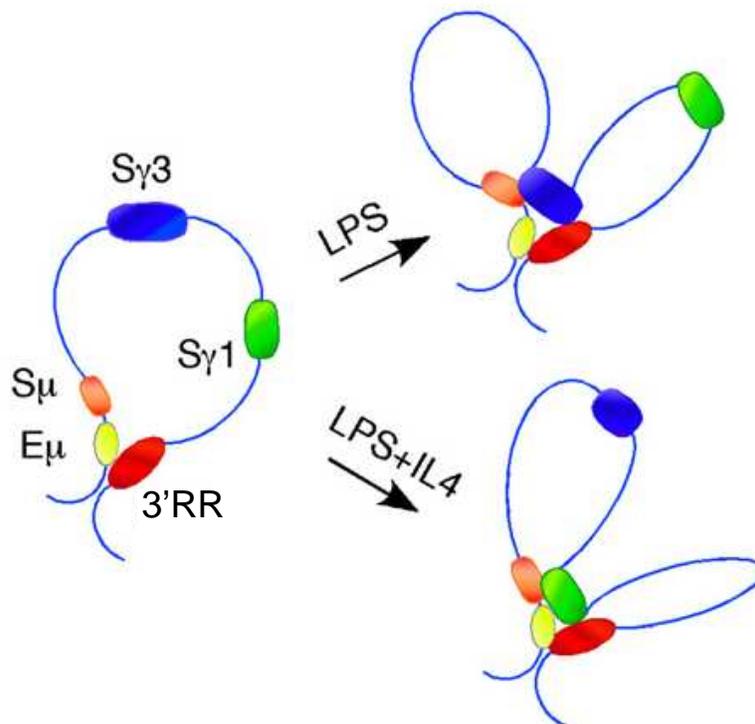


Figure 16 : Formation de la synapse S-S lors de la commutation de classe au niveau de l'interaction $E\mu$ -3'RR (Wuerffel et al., 2007).

Le schéma de gauche représente l'interaction physique entre $E\mu$ et la région 3'RR dans les cellules B au repos. Après stimulation au LPS, le promoteur germinale $\gamma3$ est recruté au complexe $E\mu$ -3'RR. En revanche, la stimulation au LPS+IL4 induit le rapprochement du promoteur $\gamma1$ à ce complexe. Ces interactions cytokines-dépendantes favorisent le rapprochement de $S\mu$ à une région S située normalement plus en aval, formant ainsi une synapse S-S qui faciliterait le switch.

Le phénotype observé précédemment en présence de la cassette *pgk-neo'* est vraisemblablement dû à une perturbation de l'accessibilité du locus IgH, suite à l'insertion de cette cassette. En effet, un défaut d'accessibilité des régions *switch* pourrait être lié à une inhibition de la transcription germinale ou à la perturbation du remodelage chromatinien. Les éléments 3' agiraient grâce à la formation de boucles permettant une interaction physique directe entre un activateur et un promoteur rendu accessible après stimulation (Arulampalam et al., 1997; Ju et al., 2007). Ainsi, il peut se produire une compétition entre le promoteur *pgk* du gène *neo'* et certains promoteurs germinaux, les privant ainsi de certains facteurs de transcription. Le gène *neo'* pourrait également jouer un rôle d'isolateur et empêcher la propagation de signaux activateurs provenant de la partie la plus en aval de la région 3'RR (**Figure 15**). Grâce à la technique du 3C (« Chromosome Conformation Capture »), les groupes de Birshtein et Kenter ont pu mettre en évidence la formation de boucle rapprochant E_{μ} de la région 3'RR formant un complexe E_{μ} -3'RR (Ju et al., 2007; Wuerffel et al., 2007). Selon les cytokines utilisées, l'activation cellulaire B conduit au recrutement des promoteurs germinaux correspondant au niveau de ce complexe (Wuerffel et al., 2007) (**Figure 16**). Ces structures favorisent la formation de synapses S-S du fait de la proximité de S_{μ} au complexe E_{μ} -3'RR et du rapprochement d'une autre région S, située normalement plus en aval. Ces synapses faciliteraient ainsi la commutation de classe. Ces interactions sont stabilisées par AID (Wuerffel et al., 2007).

L'étude d'une lignée pré-B 7OZ/3 contenant une délétion naturelle de *hs3a* et *hs1,2* a permis de montrer après fusion avec une lignée NSO (stade plasmocytaire), que ces deux *enhancers* ne sont pas nécessaires pour que la lignée réalise spontanément le *switch* (Saleque et al., 1999).

Ces résultats suggèrent que la région intervenant dans la régulation de la commutation isotypique se situent en aval de *hs1,2*. La délétion conjointe des deux éléments les plus en aval, *hs3b* et *hs4*, entraîne une diminution de la transcription germinale des régions constantes et la commutation de classe vers tous les isotypes sauf IgG1 et IgM (Pinaud et al., 2001) (**Figure 14**). Par contre, les recombinaisons V(D)J et l'hypermutation somatique ne sont pas affectées (Morvan et al., 2003). Cet effet peut s'expliquer par le fait que ces deux éléments (ou *hs4* seul) sont des régulateurs importants de la transcription germinale, ou bien par le fait qu'il s'agit d'un effet « dose » causé par la délétion de deux éléments en même temps. En effet, la délétion seule de *hs3a* ou *hs1,2* est plus facilement compensée par la présence des trois autres. Cette notion de redondance a été confirmée récemment par la délétion de *hs3b* seul qui ne conduit pas à un phénotype majeur sur le développement B (Bebin et al., 2010) (**Figure 14**).

Cette région 3'RR semble jouer un rôle important dans l'initiation de la transcription. En effet, l'ajout de combinaisons hs3a-hs1,2 ou hs3b-hs4, dans un transgène contenant le promoteur I ϵ , la région S ϵ et le gène constant C ϵ , a montré une augmentation de la transcription (Laurencikiene et al., 2007).

Lorsque le locus IgH est exprimé sans les éléments 3' dans un chromosome artificiel chez des souris transgéniques, la transcription germinale est altérée et la commutation de classe est indétectable (Dunnick et al., 2005). Ce même groupe a confirmé le rôle de la région 3'RR lors du *switch* en réalisant un transgène BAC sans cette région (Dunnick et al., 2009). Ils ont également constaté une baisse de l'hypermutation somatique.

III.3.4.2. Expression du locus IgH

Dans la lignée pré-B 70Z/3 qui présente une délétion naturelle d'environ 30 kb, comprenant hs3a et hs1,2 (Saleque et al., 1999), aucune diminution de l'expression de la chaîne μ n'a été détectée. La seule présence de E μ et des éléments distaux hs3b et hs4 suffit à induire une forte expression de la chaîne lourde à ce stade. De plus, l'hybridome 70Z/3-NSO, dérivé de la lignée pré-B, est capable spontanément de commuter vers IgG1 (Saleque et al., 1999). Nous avons vu que la délétion conjointe de hs3b et hs4 affecte la transcription germinale de la plupart des gènes constants. Il a également été montré un effet de cette délétion sur l'expression d'IgM dans les cellules au repos (Pinaud et al., 2001). Dans la lignée LP1-2 qui présente une large délétion de la région 3', on observe une très faible expression du gène α (Gregor and Morrison, 1986). Tous ces résultats suggèrent que la région 3'RR régule l'expression des gènes de chaînes lourdes réarrangés.

IV. IMPLICATION DE LA REGION 3'RR DANS LA LYMPHOMAGENESE

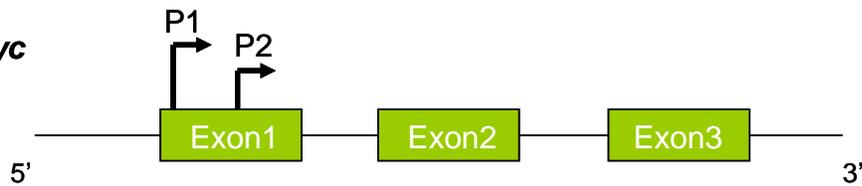
IV.1. Rappels sur le phénomène de translocation et l'apparition de lymphomes

Le lymphome B est une prolifération monoclonale massive d'une cellule B qui est bloquée à un stade précis de maturation. La majorité des lymphomes B est mature et provient de cellules issues des centres germinatifs ou post-centres germinatifs. La plupart de ces lymphomes porte les stigmates de réarrangements chromosomiques accidentels (ou translocations) qui amènent un oncogène au sein des loci IgH ou IgL. L'expression de cet oncogène passe alors sous le contrôle des éléments *cis*-régulateurs qui sont actifs dans ces loci (Heckman et al., 2003; Kuppers, 2005; Kuppers and Dalla-Favera, 2001). L'oncogène est plus fortement exprimé que dans une cellule saine et de façon non régulée, favorisant ainsi la transformation tumorale de la cellule, et l'apparition d'un clone malin.

Les processus d'excision suivis de remodelage de l'ADN, qui sont inhérents à ces loci, créent une forte instabilité, favorisant l'échange de matériel génétique avec d'autres chromosomes (Marculescu et al., 2006). Le locus IgH, remodelé tout au long du développement B, est donc une zone critique pour les événements de translocations. Ils peuvent se produire aux trois moments clés de la maturation B : 1) pendant la recombinaison entre les segments géniques D et J ; 2) après la recombinaison, au cours de l'hypermutation somatique, au niveau des segments VDJ réarrangés ; 3) dans les régions de commutation de classe.

Au cours du lymphome folliculaire, on retrouve une translocation de l'oncogène anti-apoptotique *bcl-2* dans les régions DJ du locus IgH, suggérant une translocation lors de la création du répertoire VDJ. Des translocations d'autres oncogènes prolifératifs comme *cycline D1*, *cycline D3* ou *c-maf* sont retrouvées dans les régions *switch* lors du myélome, semblant correspondre à des translocations générées durant les événements de recombinaison de classe (Kuppers, 2005). Dans tous les cas de figure, on retrouve une surexpression de l'oncogène transloqué.

A. Gène *c-myc*



B. Protéine c-Myc

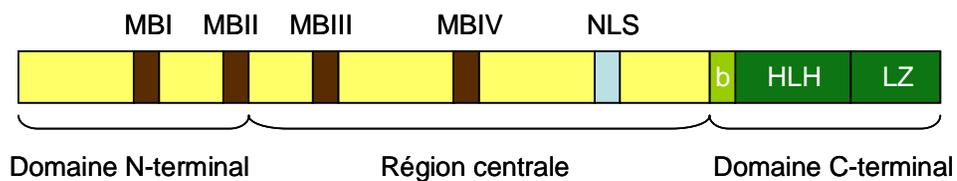


Figure 17 : Organisation génomique et protéique de *c-myc*.

A. Représentation du gène *c-myc*.

Les flèches coudées représentent les promoteurs. Les introns sont représentés par des traits fins et les exons par des rectangles.

B. Structure de la protéine *c-Myc*.

MB : Myc Box ; NLS : signal de localisation nucléaire ; HLH : hélice-boucle-hélice ; LZ : leucine zipper ; b : région basique.

IV.2. Surexpression de *c-myc* et lymphomagenèse

IV.2.1. Rôle physiologique de *c-myc*

IV.2.1.1. Structure génique et protéique

Le gène *c-myc* code pour un facteur de transcription de type « hélice-boucle-hélice » (HLH) ayant un domaine « leucine-zipper » (LZ). Il est situé sur le chromosome 8 chez l'homme (le chromosome 15 chez la souris). Il est constitué de trois exons, l'exon 1 étant non codant (**Figure 17**). Il contient deux promoteurs, P1 et P2 en amont et des séquences régulatrices en aval. P1 et P2 possèdent chacun une boîte TATA. Les exons 2 et 3 codent la protéine c-Myc (Ryan and Birnie, 1996). L'initiation de la transcription se fait principalement au niveau du promoteur P2 dans les cellules non transformées. Le gène *c-myc* est régulé par des mécanismes complexes à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. De nombreux facteurs de transcription interagissent avec *c-myc*. NF- κ B est un important facteur régulateur des promoteurs *c-myc* murin et humain.

La protéine c-Myc possède plusieurs domaines caractéristiques des facteurs de transcription (**Figure 17**) :

- un domaine d'activation de la transcription dans sa partie N-terminale contenant deux régions très conservées : les boîtes Myc I et Myc II (MBI et MBII pour *Myc Box I* et II). Ces domaines sont essentiels pour la transactivation et la transrépression des gènes cibles ;
- un domaine de localisation nucléaire (NLS) permettant à la protéine c-Myc nouvellement synthétisée de passer du cytoplasme au noyau ;
- un domaine C-terminal constitué d'une région basique impliquée dans la reconnaissance et la liaison à des séquences d'ADN spécifiques, d'une région HLH et d'une région LZ responsable de l'hétérodimérisation de c-Myc avec son partenaire Max.

Récemment, un domaine MBIII a été découvert dans la région centrale de c-Myc. C'est un médiateur de l'apoptose, de la transformation cellulaire et de la tumorigenèse (Herbst et al., 2005). Enfin, une quatrième boîte Myc (MBIV) régule la liaison à l'ADN, l'apoptose, la transformation ainsi que l'arrêt du cycle en phase G2 (Cowling et al., 2006).

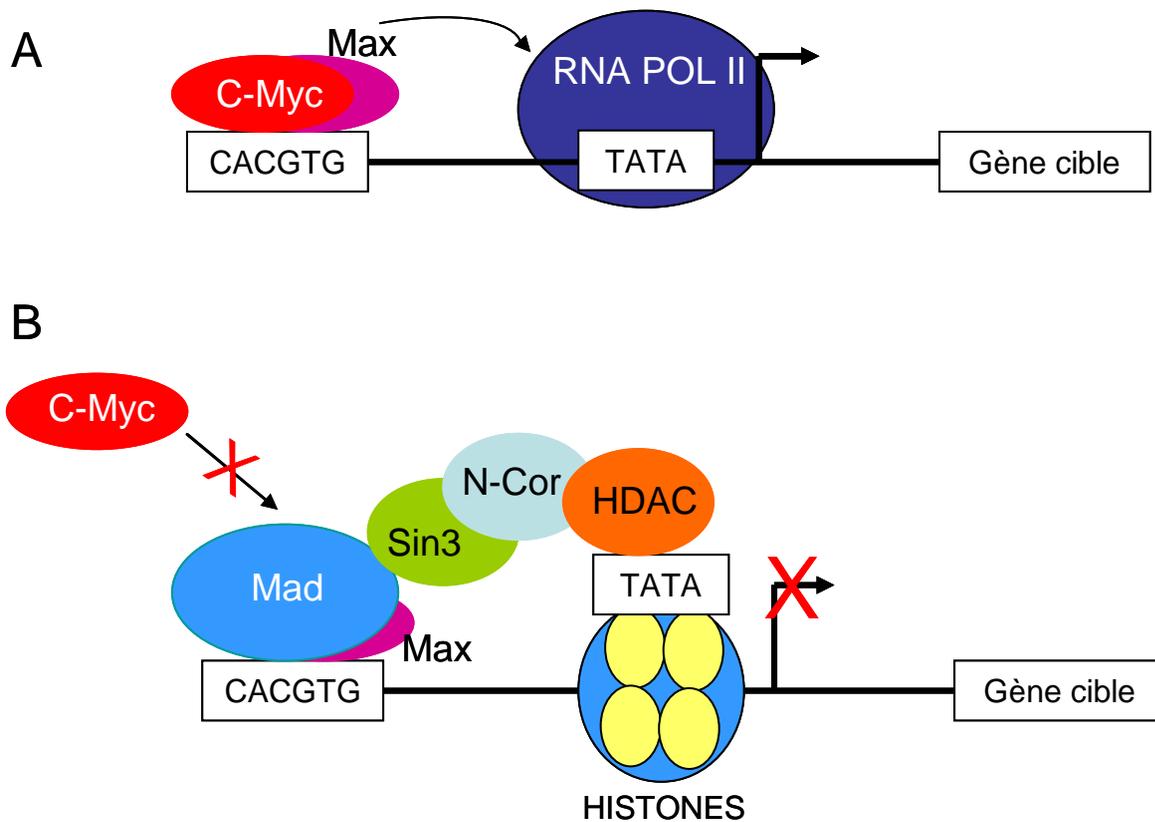


Figure 18 : Régulation transcriptionnelle par les complexes c-Myc/Max et Mad/Max.

A. Activation transcriptionnelle par le complexe c-Myc/Max.

L'hétérodimère c-Myc/Max se fixe sur la boîte CACGTG (E box), ce qui active la transcription du gène cible par la RNA polymérase II.

B. Répression transcriptionnelle par le complexe Mad/Max.

L'association de Mad/Max à la boîte E entraîne le recrutement de répresseurs transcriptionnels tels que Sin3, N-Cor et des protéines ayant des propriétés histones déacétylases (HDAC).

IV.2.1.2. Fonction de la protéine c-Myc

La protéine c-Myc forme un complexe hétérodimérique avec la protéine Max grâce à son domaine LZ. Ce complexe Myc-Max est capable de se lier à l'ADN au niveau de la boîte CACGTG (E box), ce qui induit l'activation ou la répression du gène cible. En revanche, la protéine Mad régule négativement c-Myc en formant un hétérodimère avec Max (**Figure 18**).

La protéine c-Myc est exprimée dès l'embryogenèse de façon ubiquitaire jusque dans les tissus adultes. Elle joue un rôle majeur dans le développement en intervenant dans le processus de très nombreuses fonctions biologiques telle que la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, le métabolisme et l'apoptose (**Figure 19**) (Dang, 1999; Vita and Henriksson, 2006). Les souris *knock-out* pour *c-myc* meurent au stade embryonnaire (Davis et al., 1993).

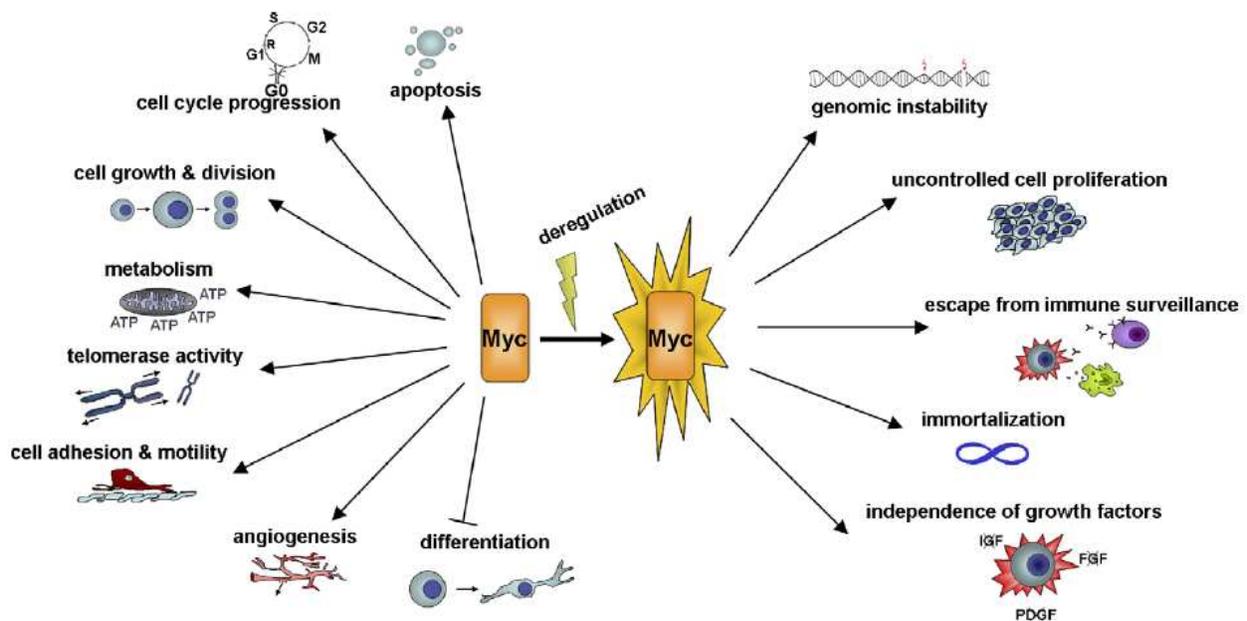


Figure 19 : Fonctions biologiques contrôlées par c-Myc dans des conditions normales et au cours de la lymphomagenèse (Vita and Henriksson, 2006).

- c-Myc et le cycle cellulaire

L'importance de c-Myc dans la prolifération cellulaire a été mise en évidence grâce au développement de souris présentant une inactivation de *c-myc* sur les deux allèles dans une lignée cellulaire fibroblastique. Le cycle cellulaire de ces cellules est caractérisé par des

phases G1 et G2 prolongées et une phase S normale (Mateyak et al., 1997). L'expression de c-Myc est liée à celle des Cyclines A et E (Hanson et al., 1994; Hoang et al., 1994; Jansen-Durr et al., 1993) et peut induire l'expression de la Cycline D1 (Daksis et al., 1994). Il a été également mis en évidence un rôle de c-Myc dans l'activation des cyclin-dépendent-kinases (Cdk). Ainsi, la coopération entre c-Myc et RAS induit l'activation de cdk1 en se fixant sur son promoteur (Born et al., 1994). Le gène *cdk4* a été également décrit comme étant une cible de c-Myc (Hermeking et al., 2000). L'action de c-Myc sur les Cdk peut se faire de trois manières différentes (Amati et al., 1998) :

- le gène *cdc25A* est une cible de c-Myc (Galaktionov et al., 1996). Il code pour une phosphatase qui va éliminer les groupements phosphates inhibiteurs présents sur Cdk2 et Cdk4 (Steiner et al., 1995) ;
- l'expression de c-Myc permet également de diminuer l'activité de p27 empêchant son effet inhibiteur sur l'activité kinase du complexe Cdk2-Cycline E (Vlach et al., 1996; Yang et al., 2001) ;
- c-Myc peut déréguler l'expression de la Cycline E inhibant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en prévenant l'action de p16INK4a (inhibiteur du complexe Cycline D/Cdk4).

- c-Myc et la différenciation cellulaire

Dans de nombreux types cellulaires, une diminution de c-Myc accompagne le processus de différenciation terminale et la sortie définitive des cellules du cycle cellulaire. L'expression ectopique de *c-myc* conduit à l'inhibition de la différenciation cellulaire (Prochownik and Kukowska, 1986) alors que son blocage par des oligonucléotides antisens, l'expression constitutive de Max ou l'expression de mutants dominants négatifs de *c-myc*, peut induire une différenciation cellulaire (Canelles et al., 1997; Griep and Westphal, 1988; Holt et al., 1988; Prochownik et al., 1988).

- c-Myc et l'apoptose

Paradoxalement, sous certaines conditions, c-Myc peut induire l'apoptose. Ainsi, l'expression constitutive de c-Myc nécessite la présence de facteurs de croissance ou de survie pour que les cellules puissent proliférer (Mo et al., 2006). En absence d'interleukine 3, des cellules hématopoïétiques surexprimant c-Myc rentrent en apoptose (Askew et al., 1991), tout comme des fibroblastes privés de sérum (Evan et al., 1992). La fonction de c-Myc serait alors de sensibiliser les cellules à l'apoptose. Pour que des cellules puissent survivre à une expression dérégulée de c-Myc, elles ont besoin soit d'un apport continu en facteurs de survie, soit de l'acquisition de mutations anti-apoptotiques supplémentaires.

L'induction de l'apoptose par c-Myc se retrouve associée à une augmentation de l'expression de la cycline A (Hoang et al., 1994).

IV.2.2. Translocation du gène *c-myc* et Lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (LB) chez l'homme (plasmocytome chez la souris, immunocytome chez le rat) est invariablement associé à une translocation de l'oncogène prolifératif *c-myc* au niveau d'un des trois loci codant les Ig. La translocation affecte majoritairement le locus IgH (80% des cas). Ce lymphome consiste en une prolifération monoclonale maligne de cellules B matures. Il est caractérisé par un aspect de « ciel étoilé » dû aux macrophages contenant des débris de corps apoptotiques, son profil immunologique (CD10⁺, CD38⁺, CD77⁺, profil caractéristique de centroblastes) et ses anomalies cytogénétiques impliquant *c-myc*. Il existe trois types de lymphomes de Burkitt : le LB endémique africain, le LB sporadique caucasien et le LB associé au déficit immunitaire lors de l'infection par le VIH (Blum et al., 2004).

Le locus IgH est soumis à de nombreux remaniements géniques au cours de la maturation B et constitue donc une zone critique pour des translocations chromosomiques. Lors du LB, la translocation de *c-myc* dans le locus IgH implique soit la région VDJ et semble correspondre à des cassures de l'ADN liées au phénomène d'hypermutation somatique, soit les régions *switch* et correspond alors à des aberrations du processus de recombinaison de classe. Le gène *c-myc* transloqué est exprimé tandis que l'allèle normal reste silencieux (Bemark and Neuberger, 2000; Kakkis et al., 1988). Le phénotype mature de ce lymphome et les cinétiques d'activation différentes des *enhancers* 5' (précoce) et 3' (tardif) du locus IgH suggèrent un rôle prépondérant de ceux de la région 3'RR dans cette surexpression oncogénique. De plus, de nombreux cas de translocations de *c-myc* au niveau du locus IgH engendrent une perte de l'activateur E μ (Kuppers and Dalla-Favera, 2001), ce qui implique que d'autres éléments régulateurs présents dans le locus jouent un rôle dans la surexpression de *c-myc*. AID pourrait jouer un rôle dans l'apparition de ces translocations (Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008) mais également dans l'expansion clonale par mutagenèse (Kotani et al., 2007).

IV.3. Dérégulation de l'expression de *c-myc* transloqué par la région

3'RR

En 1994, le groupe de Groudine a, pour la première fois, évoqué le rôle de la région 3'RR dans la régulation de l'expression de *c-myc* dans des lignées Burkitt et de plasmocytomes (Madisen and Groudine, 1994). Trois ans plus tard, le lien est confirmé (Thoger Andersen et al., 1997) grâce à une étude *in vitro* où lorsque la région 3'RR n'est plus active, l'expression de *c-myc* est réduite.

Des modèles *in vivo* chez la souris ont apporté une preuve supplémentaire du rôle prépondérant de ces éléments 3' dans la dérégulation de l'expression de *c-myc* (**Annexe 1**). Tout d'abord, des souris transgéniques possédant le gène *c-myc* humain muté (empêchant sa traduction) sous contrôle de la région 3', ont permis de montrer une surexpression de *c-myc* dès le stade B immature (Yan et al., 2007b). De plus, des souris dont le gène *c-myc* est inséré en amont ou en aval de la région 3'RR, développent des lymphomes B matures (Cheung et al., 2004; Gostissa et al., 2009; Park et al., 2005a; Park et al., 2005b). L'insertion de la région 3'RR en amont du gène *c-myc* induit chez les souris âgées de 2 à 4 mois, le développement de tumeurs B matures avec une dérégulation de l'expression de *c-myc*, une prolifération cellulaire accrue et un basculement du promoteur P2 à P1 (Wang and Boxer, 2005). Dans ce contexte, un modèle murin a été développé au laboratoire afin de mimer la surexpression de *c-myc* par la région régulatrice 3'RR par une approche de « mini locus ». La lignée murine obtenue a développé en quelques mois des tumeurs ganglionnaires B matures de type *Burkitt like* (Truffinet et al., 2007). Dans ce modèle, l'émergence de lymphomes est bien due à la surexpression de *c-myc* par les éléments de la région 3'RR.

Très récemment, il a été montré une interaction physique entre les régions VDJ et la région 3'RR mais aussi entre le promoteur de *c-myc* et la 3'RR dans des lignées de Burkitt (Ju et al., 2007; Wuerffel et al., 2007), ce qui apporte une nouvelle preuve du lien entre *c-myc* et la région 3'RR.

IV.4. Mutations au niveau du *c-myc* transloqué

L'allèle *c-myc* transloqué présente, dans plusieurs lignées de Burkitt, une accumulation de mutations, majoritairement localisées dans l'exon 1 (non traduit) et l'intron 1 (Cesarman et al., 1987; Rabbitts et al., 1983; Taub et al., 1984). Il existe deux explications possibles de l'apparition de ces mutations :

- les mutations confèrent un avantage prolifératif au clone tumoral, la fréquence de mutation n'étant pas plus élevée que celle de gènes exprimés dans la cellule ;
- les mutations apparaissent suite au phénomène d'hypermutation somatique. En effet, la translocation de *c-myc* au locus IgH se fait au niveau des régions qui subissent l'hypermutation somatique, ce qui permet à *c-myc* de devenir un substrat de ce processus.

Des études supplémentaires ont été réalisées afin de comprendre l'origine de ces mutations comme des études *in vitro* avec la lignée Ramos qui possède un allèle transloqué. L'allèle transloqué présente un taux de mutation comparable à celui des gènes V d'Ig (Bemark and Neuberger, 2000). De plus, le profil de mutation est caractéristique de l'hypermutation somatique. Les régions mutées correspondent à des séquences régulatrices importantes de *c-myc* et pourraient être un évènement critique dans l'activation de *c-myc*. Ces mutations sont également retrouvées dans d'autres types de lymphomes (Pasqualucci et al., 2001).

IV.5. Cdk4 et lymphomagenèse

IV.5.1. Rôle physiologique de cdk4

IV.5.1.1. Structure génique et protéique

Le gène *cdk4* code pour une Sérine/Thréonine kinase. Il est situé sur le chromosome 12 chez l'homme (le chromosome 10 chez la souris). Il est constitué de huit exons, l'exon 1 étant non codant.

La protéine Cdk4 est exprimée dans toutes les cellules et joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire. Pour être fonctionnelle, Cdk4 forme un complexe hétérodimérique avec une protéine de la famille des cyclines D (*ccnd1*, *ccnd2* ou *ccnd3*) impliquée dans le cycle cellulaire. Elle est souvent surexprimée lors de cancers chez l'homme (mélanomes, gliomes, sarcomes, cancers du sein, côlon, poumon).

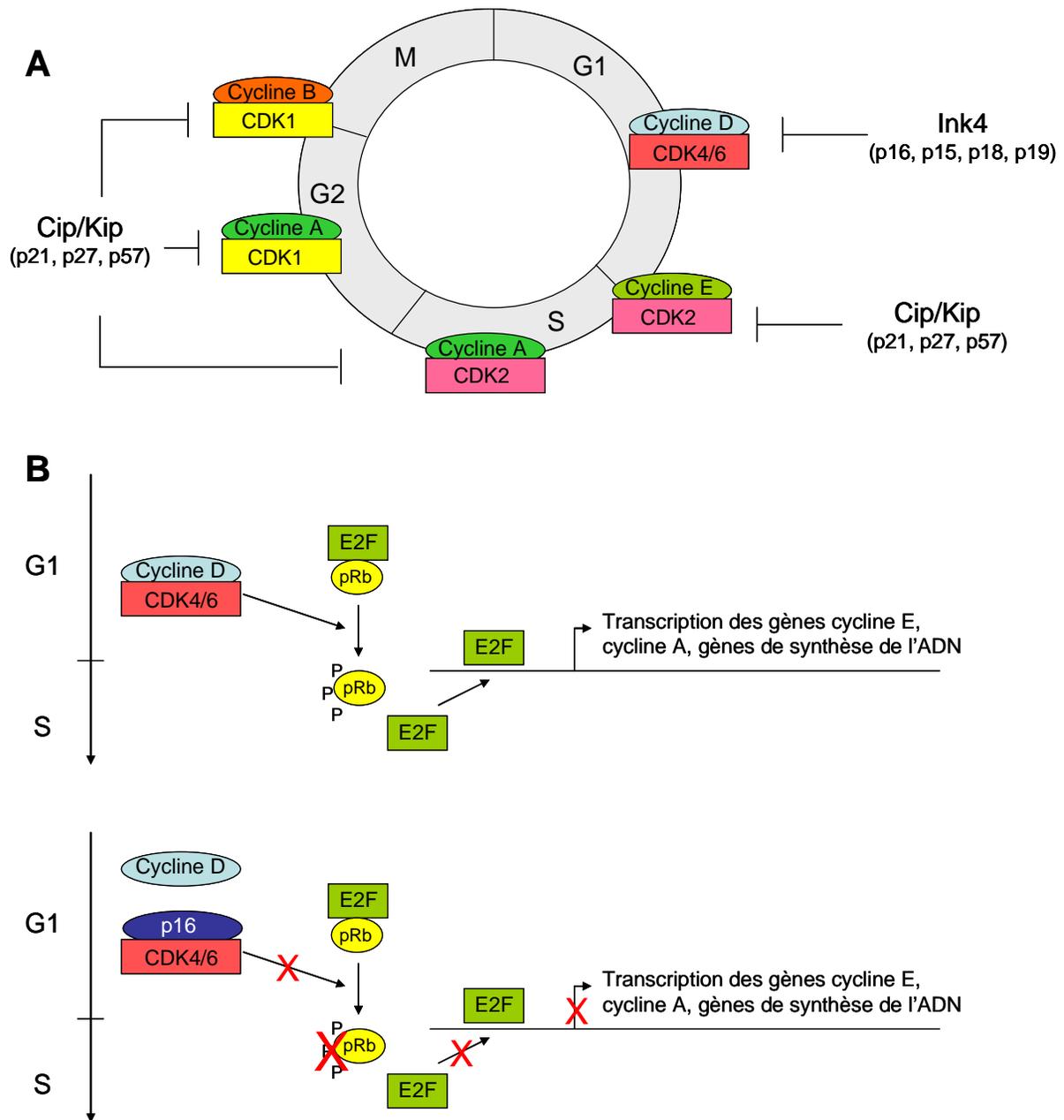


Figure 20 : Rôle de *cdk4* dans la progression du cycle cellulaire.

A. Le cycle cellulaire.

Les différentes étapes du cycle cellulaire sont contrôlées par l'activité de complexes protéiques associant une kinase (Cdk) à une sous-unité régulatrice, les Cyclines. Différents complexes Cyclines/Cdk interviennent tout au long du cycle cellulaire et leur activité est régulée par deux familles d'inhibiteurs des Cdk : Ink4 et Cip/Kip.

B. Rôle de *Cdk4* dans la transition de la phase G1 à la phase S. Le complexe *CyclineD/Cdk4* phosphoryle la protéine du rétinoblastome *pRb*, ce qui libère le facteur de transcription *E2F* qui peut se fixer sur les promoteurs de gènes nécessaires à l'entrée en phase S (Cyclines E et A, etc).

IV.5.1.2. Fonction de la protéine cdk4 dans le cycle cellulaire

Les différentes étapes du cycle cellulaire des cellules eucaryotes sont régulées par l'activité de complexes protéiques associant une kinase cycline dépendante (Cdk) et une sous-unité régulatrice appelée cycline. L'entrée des cellules en division (phase S) fait intervenir la protéine du rétinoblastome (pRb). Ces protéines non phosphorylées en phase G1 s'associent aux facteurs de transcription E2F/DP réprimant ainsi la transcription de gènes nécessaires à la phase S. C'est lors de la transition de la phase G1 à S que les complexes Cycline D/Cdk4 ou Cdk6 jouent un rôle en phosphorylant pRb ce qui libère les facteurs E2F/DP (**Figure 20**). L'activité des complexes Cycline D/Cdk4 ou Cdk6 est étroitement régulée. Il existe deux familles de protéines régulant la formation de ces complexes :

- la famille Cip/Kip qui comporte trois membres : p21, p27 et p57. Ces protéines seraient à la fois des inhibiteurs des complexes Cycline A ou E/Cdk2 (intervenant au cours de la phase S) et des activateurs des complexes Cycline D/Cdk4 ou Cdk6.
- la famille Ink4 constituée de p16, p15, p18 et p19. Ces protéines se lient directement à Cdk4 ou Cdk6, ce qui empêche son association avec les Cyclines D.

Des souris invalidées pour Cdk4/Cdk6 ou pour les Cyclines D meurent à l'état embryonnaire (16,5 jours pour les Cyclines D et 18,5 pour Cdk4/6) (Kozar and Sicinski, 2005; Malumbres et al., 2004). Les embryons ont une taille réduite mais la majorité des organes présente une morphogénèse normale. *In vitro*, ces cellules prolifèrent et rentrent en phase S à la même vitesse que des cellules sauvages. Une des explications possibles d'un tel phénotype serait l'existence d'une compensation de la perte des activités Cdk4 et Cdk6 par Cdk2 (Malumbres et al., 2004) ainsi qu'une compensation de la perte d'activité des Cyclines D par les complexes Cycline A ou E/Cdk2 (Kozar and Sicinski, 2005). Ces deux modèles montrent que les complexes Cycline D-Cdk4/6 ne sont pas indispensables à la prolifération et qu'il existe un mécanisme indépendant des Cyclines D.

IV.5.2. Implication de cdk4 dans l'oncogenèse

Chez l'homme, de nombreux cancers portent des mutations au niveau des kinases impliquées dans le cycle cellulaire qui conduisent alors à leur dérégulation et à une prolifération cellulaire incontrôlée (Santamaria and Ortega, 2006).

Lors d'une étude portant sur un groupe de familles prédisposées aux mélanomes, une mutation dans *cdk4* a été identifiée et est supposée jouer un rôle dans l'apparition des tumeurs (Wolfel et al., 1995). Cette mutation germinale ponctuelle est localisée dans l'exon 2

de Cdk4 et conduit à une substitution d'une arginine en position 24 en une cystéine (R24C). Tous les patients étaient hétérozygotes pour l'allèle *cdk4* muté. *In vitro*, cette mutation affecte le domaine de fixation de la protéine p16 à Cdk4. Ainsi, le mutant Cdk4^{R24C} échappe au contrôle négatif réalisé par p16, le complexe Cycline D/Cdk4^{R24C} est toujours actif et phosphoryle pRb ; l'entrée des cellules en phase S est continuellement activée.

Afin d'étudier le rôle de Cdk4 dans l'oncogenèse, deux modèles de souris a été créés (Malumbres et al., 2004; Rane et al., 1999). Une lignée présente une inactivation du gène *cdk4* (*cdk4*^{neo/neo}) alors que l'autre lignée possède la forme mutée de Cdk4^{R24C}. Les souris homozygotes *cdk4*^{neo/neo} sont viables mais de taille plus petite que les contrôles et sont stériles. Ces souris développent un diabète insulino-dépendant à partir du deuxième mois. Le pancréas des homozygotes présente une réduction du nombre et de la taille des îlots de Langerhans avec au sein de ces îlots une réduction majeure du nombre des cellules β . Les animaux Cdk4^{R24C} sont quant à eux légèrement plus grands, fertiles et développent spontanément une hyperplasie du pancréas endocrine (cellules β) et des cellules de Leydig. Grâce à ces modèles, l'importance fonctionnelle de Cdk4 dans le développement et/ou la survie des cellules β du pancréas endocrine a été démontrée.

Dans la lignée Cdk4^{R24C}, les souris développent spontanément des tumeurs. Deux principaux types de tumeurs apparaissent :

- des tumeurs endocrines (pancréas, testicules) chez l'animal jeune et évoluant lentement ;
- des tumeurs plus agressives tels que des sarcomes conduisant au décès rapide de l'animal.

La mutation Cdk4^{R24C} exerce une action synergique avec la perte de p53 ou de p27 dans la transformation tumorale d'animaux double mutant (Sotillo et al., 2001).

Les souris Cdk4^{R24C} ne sont pas prédisposées au développement de mélanomes comme chez l'homme. Par contre, suite à un traitement par les produits carcinogènes DMBA et TPA, ces souris deviennent sensibles et des tumeurs mélaniques se forment (Sotillo et al., 2001). Nous nous sommes intéressés à cette protéine car nous savons que Cdk4 est une cible de c-Myc (Hermeking et al., 2000) et pourrait donc être impliquée dans la lymphomagenèse B.

OBJECTIFS

Lors de la maturation B, le locus IgH subit de nombreux remaniements géniques qui vont définir le répertoire antigénique d'un individu (recombinaisons VDJ, hypermutation somatique, commutation de classe). Tous ces événements sont contrôlés par plusieurs éléments *cis*-régulateurs. Le premier *enhancer* identifié fut E μ . Il s'agit d'un élément B spécifique, avec une forte activité lors des stades précoces du développement ce qui le rend indispensable pour les étapes de recombinaisons VDJ. Une autre région plus en aval a été découverte quelques années plus tard. Il s'agit d'une grande région étendue sur près de 35 kb située en aval de C α , qui possède quatre *enhancers* transcriptionnels : c'est la région régulatrice 3'RR. Les quatre éléments sont des sites d'hypersensibilité à la DNase I d'où leur nom : hs3a, hs1-2, hs3b et hs4. Les trois premiers forment un palindrome qui possède une activité aux stades tardifs du développement B, au niveau des organes périphériques (rate, ganglions) alors que hs4 est actif dès le stade pro-B. De part son activité plus tardive, cette région 3'RR semble jouer un rôle lors de la maturation secondaire du répertoire c'est-à-dire lors de l'hypermutation somatique et de la recombinaison de classe ou *switch*. Des modèles *in vivo* chez la souris ont permis d'éclaircir le rôle d'une partie de cette région dans le développement B. Le but de mon travail a été de poursuivre l'étude de cette région 3'RR dans un contexte normal afin ensuite d'étudier le lien entre ces éléments et la lymphomagenèse.

Une première partie de mon travail a été d'invalider l'élément hs4 ainsi que toute la région 3'RR par recombinaison homologue pour mieux comprendre le rôle de celle-ci lors de la maturation B.

La seconde partie de mon travail a été de participer à l'étude du rôle de cette région 3'RR lors du développement de lymphomes et plus particulièrement lors du lymphome de Burkitt, caractérisé par une translocation du gène *c-myc* au locus IgH. Cette translocation conduit à la surexpression de *c-myc* par les éléments régulateurs présents dans ce locus. Un modèle de souris a été créé au laboratoire, mimant la surexpression de *c-myc* par les éléments de la région 3'RR (modèle *c-myc*-3'RR). Ces souris développent des tumeurs similaires à celles d'un lymphome de Burkitt (Truffinet et al., 2007). J'ai participé à leur caractérisation. En parallèle, nous avons regardé l'implication de la protéine Cdk4 et surtout de son expression constitutive dans le modèle *c-myc*-3'RR.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

Etude du rôle de la région régulatrice 3'RR dans la lymphopoïèse B.

Article 1 : Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region.

Christelle Vincent-Fabert, Véronique Truffinet, Rémi Fiancette, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Journal of Immunology, 2009, Volume 182, pages 6926-6932.

Article 2 : Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Eric Pinaud, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Blood, 2010, [Epub ahead of print]

DEUXIEME PARTIE

Etude du rôle de la région 3'RR dans la lymphomagenèse B.

Article 3 : Uncoupling between Ig somatic hypermutation and oncogene mutation in mouse lymphoma.

Christelle Vincent, Véronique Truffinet, Rémi Fiancette, Barbara Petit, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Biochimica Biophysica Acta, 2009, Volume 1793, pages 418-426.

Article 4 : Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Leukemia Research, 2009, Volume 33, pages 203-206.

Article 5 : Cdk4 does not impede B cell maturation but cooperates with c-myc in the generation of chronic B-cell lymphocytic leukaemia in transgenic mice.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Christel Baudet, Véronique Truffinet, Michel Cogné, Pierre Dubus, Yves Denizot

Soumission Oncogene

PREMIERE PARTIE

Etude du rôle de la région régulatrice 3'RR dans la lymphopoïèse B.

Article 1 : Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region.

Christelle Vincent-Fabert, Véronique Truffinet, Rémi Fiancette, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Journal of Immunology, 2009, Volume 182, pages 6926-6932.

Le locus IgH subit de nombreux remaniements géniques définissant ainsi un grand répertoire lymphocytaire B. Des éléments *cis*-régulateurs vont organiser ces différents événements. μ est celui qui agit dès les stades précoces du développement B et qui est essentiel pour les recombinaisons VDJ. D'autres éléments situés en 3' des gènes constants constituent la région 3'RR. Elle est composée de quatre *enhancers* : hs3a, hs1-2, hs3b et hs4. Cette région est principalement active aux stades tardifs du développement (à l'exception de hs4 qui est actif dès le stade pro-B) ce qui suggère qu'elle posséderait un rôle potentiel lors des recombinaisons secondaires (hypermutation somatique et *switch*). Des études *in vitro* ont montré que la perte de la région 3'RR diminue considérablement la transcription d'Ig (Gregor and Morrison, 1986). Des souris transgéniques portant un chromosome artificiel bactérien (BAC) composé d'un gène avec la région variable VDJ réarrangée et la région 3'RR, montrent que cette région 3' augmente la transcription germinale et le *switch* (Dunnick et al., 2005). Afin d'identifier le rôle de la région 3'RR, des souris portant des délétions plus ou moins longues de celle-ci ont été créées. La suppression de l'élément hs3a ou hs1,2 n'affecte pas la lymphopoïèse B (Manis et al., 1998b). Par contre, la délétion conjointe de hs3b/hs4 entraîne une sévère baisse de la synthèse d'Ig et du *switch* vers la plupart des isotypes (Pinaud et al., 2001). Ce phénotype est-il dû à la délétion seule de hs3b, de hs4 ou à la délétion de toute la région ? Plusieurs arguments vont dans le sens d'un effet dû à la délétion de hs4 :

- la délétion seule de hs3a (homologue de hs3b à 97%) n'a pas d'effet sur la synthèse d'Ig et le *switch* (Manis et al., 1998b) ;
- hs3b est absent chez l'homme (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997) ;
- hs4 est un élément continuellement actif au cours du développement B alors que hs3b ne l'est qu'aux stades tardifs (Garrett et al., 2005; Giambra et al., 2008).

Afin de répondre à cette question, j'ai créé une lignée de souris transgénique déficiente pour l'élément hs4. Les principales conclusions sont les suivantes :

- la délétion de hs4 ne modifie pas le nombre de lymphocytes B dans la moelle osseuse de ces souris. La proportion de cellules pro-B, pré-B et B immatures est inchangée malgré l'absence de hs4. Aucune différence n'est également retrouvée dans le sang. Les seuls changements notables se trouvent dans la rate où le nombre de cellules B IgM/IgD⁺ est légèrement, mais significativement, diminué et où l'on note une baisse de l'expression des IgM et IgD à la surface des cellules ;
- la capacité des cellules à proliférer, en réponse au LPS ou à l'anti-CD40, ne change pas. Ces cellules sont tout à fait capables de se transformer en plasmablastes. La délétion de hs4 n'affecte pas la capacité apoptotique des cellules B ;
- il n'y a pas de différence dans la production *in vivo* et *in vitro* des Ig. Les souris répondent normalement à une stimulation antigénique thymo-indépendante (DNP-ficol) ou thymo-dépendante (ovalbumine).

En conclusion, la délétion de l'élément hs4 n'induit pas de phénotype notable sur la lymphopoïèse B. Ceci est assez surprenant étant donné son activité tout au long du développement B et sa localisation à l'extérieur du palindrome qui lui suggérait un rôle particulier. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une redondance entre les différents éléments de la région 3'RR. La présence des trois autres (hs3a, hs1-2 et hs3b) doit certainement compenser l'absence de hs4. Aucune invalidation individuelle n'a conduit à un changement phénotypique majeur. Ainsi, les souris Δ hs3a, Δ hs1-2, Δ hs3b et Δ hs4 ne développent pas de phénotype particulier. Seule la délétion des deux derniers (hs3b et hs4) entraîne une altération de la maturation B. C'est pourquoi, afin de comprendre le rôle de la région 3'RR dans sa globalité, j'ai, par la suite, entrepris la délétion de la totalité de cette région.

Article 2 : Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Eric Pinaud, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Blood, 2010, [Epub ahead of print]

Nous venons de voir qu'il existe une redondance dans l'activité des éléments de la région 3'RR puisque la délétion d'un seul de ces quatre sites hs n'entraîne pas de changement phénotypique (Bebin et al., 2010 ; Manis et al., 1998b). Par contre, la délétion d'au moins deux éléments affecte les phénomènes de maturation secondaire (Pinaud et al., 2001). Dans ce contexte, nous avons décidé d'éliminer la totalité de la région 3'RR (souris $\Delta 3'RR$) et de regarder l'impact de cette délétion sur la synthèse d'Ig et le *switch*. J'ai suivi la même démarche expérimentale que pour la délétion de hs4 et les principaux résultats sont les suivants :

- la compartimentation B dans la moelle osseuse, le sang et la rate de ces souris est normale ;
- les cellules répondent normalement à une stimulation au LPS ou à l'anti-CD40 et sont capables de se transformer en plasmablastes. L'apoptose cellulaire est normale ;
- Par contre, nous avons noté une très forte baisse de la synthèse d'Ig *in vivo* et *in vitro* corrélée à une abolition du *switch*. Nous avons observé que cette perte de *switch* était due à une baisse de la transcription germinale (variable selon les isotypes) et une plus forte diminution voire une absence des transcrits *switchés* μ -Cx ainsi que des cercles formés lors du *switch*.

Grâce à ce modèle, nous montrons que la région 3'RR joue un rôle important dans les stades B tardifs. Elle est indispensable pour la réalisation du *switch* et la synthèse d'Ig. La transcription est également affectée ce qui indique que la présence de la région 3'RR est importante pour l'accessibilité des régions *Switch*. Dans ce modèle, l'isotype IgG1 semble le moins touché ce qui suggérerait que d'autres éléments régulent cet isotype. $E\mu$ serait un des candidats possibles puisqu'on sait maintenant que lors du *switch*, des synapses S-S se forment en présence de $E\mu$ et de la région 3'RR qui interagissent physiquement (Ju et al., 2007; Wuerffel et al., 2007). Nous ne retrouvons pas la baisse d'expression d'IgM rencontrée pour la délétion de hs4. Nous supposons que la délétion complète de la région 3'RR enlèverait également des éléments inhibiteurs qui seraient encore présents lorsque seul hs4 est supprimé.

DEUXIEME PARTIE

Etude du rôle de la région 3'RR dans la lymphomagenèse B.

Article 3 : Uncoupling between Ig somatic hypermutation and oncogene mutation in mouse lymphoma.

Christelle Vincent, Véronique Truffinet, Rémi Fiancette, Barbara Petit, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Biochimica Biophysica Acta, 2009, Volume 1793, pages 418-426.

Le lymphome de Burkitt est invariablement associé à une translocation du gène *c-myc* majoritairement dans le locus IgH. L'expression de *c-myc* est alors fortement dérégulée suite à sa juxtaposition aux éléments *cis*-régulateurs, ou *enhancers*, actifs dans ce locus. La région 3'RR pourrait jouer un rôle dans l'apparition du lymphome de Burkitt. Pour vérifier cette hypothèse, un modèle de souris a été créé mimant la dérégulation de *c-myc* par les éléments de la région 3'RR (Truffinet et al., 2007). Ces souris transgéniques portent un transgène *c-myc*-3'RR avec de part et d'autre des isolateurs qui protègent le transgène des influences de la chromatine adjacente. Les souris développent des lymphomes de type *Burkitt-like*. La région 3'RR est donc capable, à elle seule, de déréguler *c-myc* et de conduire à l'émergence d'un lymphome.

Chez l'homme, la majorité des allèles *c-myc* transloqués contiennent des altérations de séquences, le plus souvent des mutations ponctuelles au niveau de l'exon 1 (Rabbitts et al., 1983; Taub et al., 1984). J'ai analysé le statut mutationnel des lymphomes B issus des souris *c-myc*-3'RR pour vérifier s'il se rapprochait de celui observé chez l'homme. Contrairement au lymphome de Burkitt humain, les tumeurs des souris *c-myc*-3'RR n'expriment pas la protéine Bcl-6 (exprimée dans les cellules B matures des centres germinatifs) et ne possèdent pas de région VDJ hypermutée. Nous avons néanmoins trouvé une accumulation de mutations dans l'exon 1 du *c-myc* transgénique. Ces mutations sont majoritairement des substitutions et sont situées en amont des promoteurs P1 et P2. De nombreuses mutations sont localisées dans des sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription décrits comme inhibiteur de la transcription de nombreux gènes dont *c-myc*. Ces mutations sont principalement des transitions ce qui laisserait supposer une action de AID.

En conclusion, l'association de *c-myc* avec la région 3'RR conduit à la formation de tumeurs à partir de cellules B naïves et recruterait AID d'une manière indépendante de la présence d'un antigène. Ces mutations pourraient être sélectionnées pour leur efficacité sur la dérégulation de *c-myc*.

Article 4 : Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné, Yves Denizot.

Leukemia Research, 2009, Volume 33, pages 203-206.

Les variations génétiques jouent un rôle important dans la susceptibilité aux cancers chez l'homme. Afin de mieux comprendre leur apparition, nous utilisons, comme modèle d'étude, la souris. Les souris constituent une population uniforme avec un fond génétique homogène qui permet d'étudier plus facilement la surexpression d'oncogènes. Le lymphome de Burkitt apparaît suite à la translocation du gène *c-myc* au locus IgH. La région 3'RR joue un rôle dans la dérégulation de cet oncogène comme le montre les souris *c-myc-3'RR* dans le fond génétique C57BL/6 (Truffinet et al., 2007). Ces souris développent des tumeurs, à partir de cellules B naïves, de type *Burkitt-like*.

Nous avons voulu savoir si, dans un fond génétique différent, nous obtenions ce même phénotype tumoral. Pour cela, j'ai dérivé une lignée *c-myc-3'RR* BALB/c en croisant les souris *c-myc-3'RR* C57BL/6 avec des souris de fond génétique BALB/c. Contrairement aux souris de fond C57BL/6, les souris *c-myc-3'RR* BALB/c ne développent pas de lymphomes. Cette absence de tumeur n'est pas due à un manque d'expression du *c-myc* transgénique dans le fond BALB/c mais plutôt au fait que, dans ce fond génétique, la surexpression de *c-myc* ne se traduit pas par une augmentation de la capacité de prolifération des cellules B.

Le fond génétique BALB/c apparaît donc être résistant au développement de lymphome par le transgène *c-myc-3'RR*. Cependant, ces souris sont connues pour avoir une susceptibilité à développer des plasmocytomes qui sont des tumeurs B plus matures que le lymphome de Burkitt (Janz, 2008). Chez ces souris, il existe un polymorphisme génétique du gène p16 (Ink4a) qui expliquerait le développement de telles tumeurs. Ink4a est un inhibiteur du complexe CyclineD/Cdk4 impliqué dans l'entrée en cycle des cellules. Il serait intéressant de regarder si ce gène est responsable de la résistance à l'effet de notre transgène. Nous nous sommes, par la suite, intéressés aux relations cMyc/Cdk4 dans le modèle murin *c-myc-3-RR*.

Article 5 : Cdk4 does not impede B cell maturation but cooperates with c-myc in the generation of chronic B-cell lymphocytic leukaemia in transgenic mice.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Christel Baudet, Véronique Truffinet, Michel Cogné, Pierre Dubus, Yves Denizot

Soumission Oncogene

La régulation de la progression du cycle cellulaire est une étape critique du développement de tumeurs. Les différentes étapes du cycle cellulaire sont régulées par les complexes cyclines/cyclines-dépendantes kinases (Cycline/Cdk). La transition de la phase G1 à S nécessite l'action des cyclines D et des Cdk4 ou 6 qui phosphorylent la protéine du rétinoblastome (pRb). La protéine p16 est un régulateur négatif des cdk4/6. Elle se fixe à la cycline D, empêchant ainsi la liaison de Cdk4/6 et la phosphorylation de pRb. Le changement d'expression de Cdk4/6 ou la suppression de l'activité de p16 peuvent jouer un rôle dans la lymphomagenèse (Corcoran et al., 1999; Hayette et al., 2003; Marzec et al., 2006).

Pour comprendre le rôle de Cdk4 dans le développement de lymphomes, nous avons voulu savoir quelles seraient les conséquences d'une expression constitutive de Cdk4, causée par la perte d'interaction entre Cdk4 et p16, sur la maturation B. Pour cela, j'ai utilisé des souris mutées dont l'acide aminé arginine en position 24 est remplacé par une cystéine (Cdk4^{R24C}) (Rane et al., 1999). Nous avons montré que cette mutation n'a aucun effet sur le développement B et ne prédispose pas ces souris à développer des tumeurs B. J'ai ensuite regardé ce que l'ajout de la mutation Cdk4^{R24C} pouvait engendrer dans notre modèle *c-myc-3'RR*, *cdk4* étant une cible de c-Myc (Hermeking et al., 2000). Les souris *c-myc/cdk4^{R24C}* ne développent plus de tumeurs de type *Burkitt* mais de type *leucémie lymphoïde chronique (LLC)-like*. Ces tumeurs se déclenchent plus tardivement (au bout de 5 mois environ) et sont caractérisées par une augmentation du nombre de globules blancs dans le sang et une splénomégalie. Elles possèdent toutes les caractéristiques des LLC humaines :

- les cellules sont CD5⁺ ; CD43⁺ ; CD19⁺ ; IgM⁺ ; IgD^{low} ;
- la capacité de prolifération est faible ;
- grâce à une étude du transcriptome, nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression du gène pro-apoptique *fas*, une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques et de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.

Ces résultats montrent que Cdk4 joue un rôle particulier dans la prolifération dirigée par c-Myc. Cette protéine est capable de coopérer avec c-Myc pour la transformation cellulaire. Ce modèle indique également que les régulateurs négatifs Ink4a sont importants dans la prévention de la lymphomagenèse.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Première partie : rôle de la région 3'RR dans la lymphopoïèse B

- *Stratégie choisie*

Au cours de cette thèse, je me suis, dans un premier temps, intéressée au rôle de la région régulatrice 3'RR lors de la maturation B. La meilleure stratégie à adopter lorsque l'on étudie une partie du génome est de réaliser un *knock-out* (KO) de cette région et de regarder l'impact de cette délétion chez la souris *in vivo*. L'invalidation de la région génique se fait alors par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (ES) et consiste au remplacement d'un allèle de type sauvage par un allèle muté. Les premières étapes de cette invalidation génique consistent en la création d'un vecteur de clonage dans lequel on insère deux bras 5' et 3' (copies conformes des deux régions en amont et en aval de celle à éliminer) et différentes cassettes de sélection permettant de cribler les cellules ES recombinantes. En général, on utilise les deux gènes suivants pour la sélection :

- la cassette *néomycine^R* (*néo^R*) : cette cassette comprend le gène de résistance à la néomycine. Il est placé entre les bras 5' et 3' et va remplacer la région d'intérêt dans la cellule lors de la recombinaison homologue. Il s'agit d'une sélection positive et toutes les cellules qui auront intégré le vecteur seront résistantes à l'antibiotique néomycine ;
- la cassette *thymidine kinase* (*tk*) : ce gène est placé à l'extérieur d'un des bras. Cette cassette permet une sélection négative des clones ES c'est-à-dire que les cellules qui posséderont encore ce gène n'auront pas effectué correctement la recombinaison homologue et seront tuées par l'action du gancyclovir.

Les cellules ES recombinées sur un allèle sont ensuite injectées dans des blastocystes, eux-mêmes réimplantés dans des souris pseudo-gestantes afin d'obtenir des chimères. Une lignée homozygote pour la délétion de la région d'intérêt est ensuite dérivée de ces chimères et possède alors le gène *neo^R*, à la place de la région à étudier, sur les deux allèles. Le phénotype de ces souris peut être influencé par l'ajout de ce gène. Pour cela, les souris *neo^R/neo^R* sont croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinase Cre qui va l'éliminer : on obtient des souris Δ/Δ .

- *Développement du projet de thèse*

Pour la région 3'RR, le premier KO réalisé a été celui de l'élément hs1,2 qui était alors remplacé par *neo^R* (Cogne et al., 1994). Ces souris ont des difficultés à produire des Ig

et à réaliser le *switch* vers certains isotypes *in vitro* et *in vivo*. Le même phénotype a été obtenu pour le remplacement de hs3a par *neo^R* (Manis et al., 1998b). Ces deux modèles nous ont montré l'importance d'éliminer le gène *neo^R* puisque chez les souris Δ/Δ hs3a ou hs1,2, le développement B redevient normal (Manis et al., 1998b). La cassette *neo^R* doit perturber l'accessibilité du locus IgH en jouant le rôle d'isolateur en empêchant la propagation de signaux activateurs provenant des autres éléments situés en aval (Ju et al., 2007). Quelques années plus tard, la délétion propre (c'est-à-dire sans *neo^R*) des deux derniers éléments hs3b et hs4 a montré une baisse de la synthèse d'Ig et du *switch* vers la plupart des isotypes (sauf μ et $\gamma 1$) et une baisse de l'expression d'IgM dans les cellules au repos (Pinaud et al., 2001). Par contre l'hypermutation somatique n'est pas affectée (Morvan et al., 2003). Le phénotype observé dans le modèle murin KO hs3b/hs4 est-il dû à la délétion seule de hs3b ? ou de hs4 ? ou de toute la région entre hs3b et hs4 ? Certaines données permettent de penser que la suppression de l'élément hs4 joue un rôle dans l'apparition de ce phénotype. En effet, hs4 est le seul élément de la région 3'RR à être actif tout au long du développement B. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de réaliser le KO de l'élément hs4. En parallèle, nous avons également essayé de réaliser le KO de toute la région 3'RR pour analyser son rôle global sur la maturation B. Plusieurs groupes scientifiques avaient tenté auparavant de réaliser le KO de toute la 3'RR, sans succès. En effet, cette région est difficile à éliminer en une seule fois puisqu'elle s'étend sur environ 35 kb. Il s'agit également d'une région riche en G/C avec une structure palindromique des trois premiers éléments.

- *La région 3'RR joue un rôle majeur dans la lymphopoïèse B tardive.*

Notre étude sur le KO hs4 confirme que l'élimination d'un seul élément de la région 3'RR n'a pas d'effet notable sur le développement B (**article 1**). Par contre, l'absence de toute la région 3' abolit complètement le *switch* et altère considérablement la synthèse d'Ig (**article 2**). Cette région joue donc un rôle très important pour ces deux processus en contrôlant notamment l'accessibilité des régions S. L'absence de la région 3'RR annule son interaction avec $E\mu$ ce qui empêche certainement le rapprochement des régions S et la formation des synapses S-S au niveau des boucles d'interaction entre $E\mu$ et la région 3'RR. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la présence de ces différentes boucles d'interaction dans les modèles KO 3'RR et KO hs4 par la technique 3C (*Chromosome Capture Conformation*).

J'ai également regardé dans le modèle KO 3'RR la présence ou non d'hypermutation somatique dans les régions variables VDJ réarrangées. Des résultats préliminaires montrent

une légère baisse de la fréquence de mutations. Cependant, dans les cellules B activées, la transcription est diminuée ce qui peut expliquer cette diminution. La région 3'RR ne participerait alors pas directement au processus d'hypermutation des régions VDJ mais jouerait plutôt un rôle dans l'accessibilité de celles-ci en contrôlant la transcription. D'autres expériences doivent être menées pour améliorer ces résultats, notamment en augmentant la taille de la région à séquencer. Ces résultats n'ont pu être menés à leur terme durant ma thèse à cause de la destruction de l'animalerie et la perte de la lignée 3'RR. La ré-obtention, il y a quelques semaines, de la lignée au stade hétéro *neo^R* laisse présager la poursuite de cette étude dans les six à neuf mois à venir.

- *Perspectives*

Nous venons de voir que la région 3'RR était très importante pour les processus de recombinaison isotypique et d'hypertranscription au stade plasmocytaire B. Nous pouvons également constater qu'un effet sur la maturation B n'apparaît que lorsqu'au moins deux éléments sont éliminés. La délétion conjointe des deux derniers sites (hs3b et hs4) a montré une baisse de la synthèse d'Ig et du *switch* vers la plupart des isotypes sauf μ et $\gamma 1$. Il serait intéressant de regarder si après élimination des deux premiers hs (hs3a et hs1,2), on affecte la production de ces deux isotypes (**Annexe 2**). La délétion de toute la région 3' affecte la production de tous les isotypes. Seul IgG1 semble encore être faiblement produit. Un autre candidat potentiel pour la synthèse d'IgG1 serait l'activateur intronique $E\mu$. Il faudrait alors réaliser le double KO $E\mu$ /hs3b-hs4 ou $E\mu$ /hs3a-hs1,2 et étudier chez ces souris la synthèse d'IgG1. $E\mu$ n'influence quasiment pas les processus d'hypermutation somatique. La région 3'RR ne l'affecte que partiellement. Un double KO $E\mu$ /3'RR permettrait de voir si la double délétion a un impact sur le processus d'hypermutation somatique.

Tous les KO existants ont été réalisés pour étudier le rôle des *enhancers* de cette région 3'RR. Or, les trois premiers éléments forment un palindrome. Cette structure palindromique est-elle importante pour la lymphopoïèse B ? Un phénotype semble apparaître seulement lorsqu'on touche à un des éléments du palindrome (KO hs3b/hs4) ou à tout celui-ci (KO 3'RR). Cependant les KO hs3a, hs3b ou hs1,2 ne conduisent pas à un changement de la maturation B (Bebin et al., 2010 ; Manis et al., 1998b). Est-ce que les régions répétées inversées (IR) présentes à l'intérieur de ce palindrome sont importantes ? Pour cela, un projet est en cours dans lequel les régions IR entre hs3a et hs1,2 sont éliminées et où hs3a et hs1,2 sont ré-introduits, avec hs3a dans le même sens que hs3b (**Annexe 3**). Ainsi on perturbe la structure palindromique tout en gardant les *enhancers* 3'.

Deuxième partie : rôle de la région 3'RR dans la lymphomagenèse B

- *Modèle d'étude utilisé : souris c-myc-3'RR.*

Le lymphome de Burkitt (LB) est caractérisé par une translocation du gène *c-myc* dans un des trois loci des Ig (majoritairement le locus IgH). L'expression de *c-myc* est alors fortement dérégulée suite à sa juxtaposition aux éléments régulateurs du locus IgH. Ce lymphome se développe à partir de cellules B matures. La région 3'RR est toujours présente lors de translocations chromosomiques, contrairement à E μ qui, dans certains cas, se retrouve éliminé. La région 3'RR jouerait peut-être un rôle dans la dérégulation de l'oncogène *c-myc*. Afin d'évaluer plus précisément son rôle dans la surexpression de *c-myc*, un modèle murin a été créé dans lequel le gène *c-myc* est mis sous contrôle de la région 3'RR (Truffinet et al., 2007). Ces souris développent des tumeurs de type *Burkitt-like* (BL) se rapprochant du LB humain.

- *La dérégulation du c-myc transgénique est associée à une accumulation de mutations dans la région promotrice de c-myc (article 3).*

Nous avons cherché à caractériser le phénotype précis des tumeurs BL de souris *c-myc-3'RR*. Comme lors de LB humains, de très nombreuses mutations sont observées au voisinage de la région promotrice de *c-myc*. Ces mutations sont principalement présentes en amont des promoteurs P1 et P2. Elles pourraient favoriser le changement de promoteur P2 vers P1 (un des premiers événements favorisant la dérégulation de *c-myc*). Ces mutations confortent le caractère relevant du modèle *c-myc-3'RR* comme un bon modèle mimant le LB humain. La protéine AID pourrait être à l'origine de l'accumulation de ces mutations mais actuellement aucune preuve directe ne l'a démontré. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser les tumeurs BL de souris *c-myc-3'RR* dans un fond AID^{-/-}. L'étude des régions VDJ des tumeurs BL murines montre que celles-ci se développent à partir de cellules B naïves (régions non hypermutées) ce qui est différent du statut post-centre germinatif des tumeurs LB humaines. Or, la plupart des lymphomes murins sont de type pré-centre germinatif et dans la majorité des cas la région variable est non hypermutée. Ce dernier caractère n'invalide donc pas les souris *c-myc-3'RR* comme étant un bon modèle pour l'étude du LB humain.

- *Le fond génétique des souris est important pour l'étude en cancérologie.*

L'utilisation de modèles murins possède de nombreux avantages pour l'étude en cancérologie dont notamment l'homogénéité du fond génétique. Ainsi nous pouvons étudier l'apparition de tumeurs et tester d'éventuels traitements sans prendre en compte le polymorphisme génétique de chaque animal. Le modèle *c-myc-3'RR* a été réalisé dans le fond génétique C57Bl/6. Afin de regarder si le transgène *c-myc-3'RR* introduit dans un autre fond génétique était capable de produire les mêmes tumeurs, nous avons transféré le transgène dans le fond BALB/c. Les souris *c-myc-3'RR* BALB/c ne développent pas de tumeurs *Burkitt-like* (**article 4**). Ce sont des souris très résistantes au développement de lymphomes mais qui sont connues pour avoir une susceptibilité à développer des plasmocytomes (tumeurs B très matures). Ces souris possèdent un polymorphisme génétique au niveau du gène *p16* qui expliquerait le développement tardif de telles tumeurs. Nous avons confirmé que le fond génétique des souris est très important pour la susceptibilité à produire des tumeurs et qu'il faut le prendre en compte pour la caractérisation des tumeurs, l'étude de leur apparition et des études pharmacologiques ou pharmacocinétiques des traitements expérimentaux.

- *L'expression constitutive de Cdk4 change le phénotype tumoral des souris c-myc-3'RR.*

L'émergence d'un clone tumoral se produit en plusieurs étapes et fait généralement intervenir la dérégulation du cycle cellulaire aboutissant à une prolifération incontrôlée. Une des propriétés fonctionnelles de c-Myc est d'agir sur le cycle cellulaire, notamment en ciblant la protéine Cdk4 impliquée dans la transition de la phase G1 à la phase S (Hermeking et al., 2000). Son association avec une cycline D lui permet de phosphoryler la protéine du rétinoblastome pRB, ce qui libère les facteurs de transcription E2F qui vont activer les gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire en phase S.

Chez l'homme, il existe un groupe de familles prédisposées aux mélanomes à cause d'une mutation dans *cdk4* (Wolfel et al., 1995). Cette mutation consiste au remplacement d'une arginine par une cystéine (R24C) et provoque une absence de fixation de la protéine p16 connue pour réguler négativement l'activité de Cdk4. Un modèle de souris reproduisant cette mutation, a été créé (Rane et al., 1999). Ces souris développent un large spectre de tumeurs. Ces souris ont un développement B normal et ne sont pas sensibles à l'émergence de lymphomes B. Cette protéine étant une cible de c-Myc, nous avons regardé l'impact de l'expression constitutive de Cdk4 dans le modèle « Burkitt-like ». Nous avons constaté un changement de phénotype des tumeurs créées par les souris doubles transgéniques qui

développent alors une leucémie lymphoïde chronique B. Les leucémies se développent plus tardivement que les tumeurs chez les souris *c-myc-3'RR*. Comme pour le modèle *c-myc-3'RR*, le transgène *c-myc* est hypermuté dans l'exon 1. Nous avons ainsi créé un nouveau modèle de tumeurs B qui pourrait être un outil intéressant pour l'étude des LLC humaines et pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. Grâce à ce modèle, nous montrons l'importance de la régulation du cycle cellulaire par p16 et que Cdk4 peut jouer un rôle dans la lymphomagenèse B lorsque son association avec une cycline D n'est plus contrôlée. Une proportion importante de tumeurs humaines porte une invalidation du gène suppresseur de tumeur p53. Celui-ci freine l'entrée des cellules en cycle cellulaire par son effet activateur de l'inhibiteur p21 mais aussi un activateur de l'apoptose par la voie fas. Il serait intéressant d'étudier le rôle du gène suppresseur de tumeur *p53* dans nos modèles *c-myc-3'RR* et *c-myc-3'RR/cdk4^{R24C}* afin de voir le comportement des souris face à l'invalidation de p53 dans un contexte d'hypertranscription de *c-myc*.

ANNEXES

ANNEXE 1

Revue : The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Michel Cogné, Eric Pinaud, Yves Denizot

Accepté à l'European Journal of Immunology avec minor modification

ANNEXE 2 : KO hs3a-hs1,2

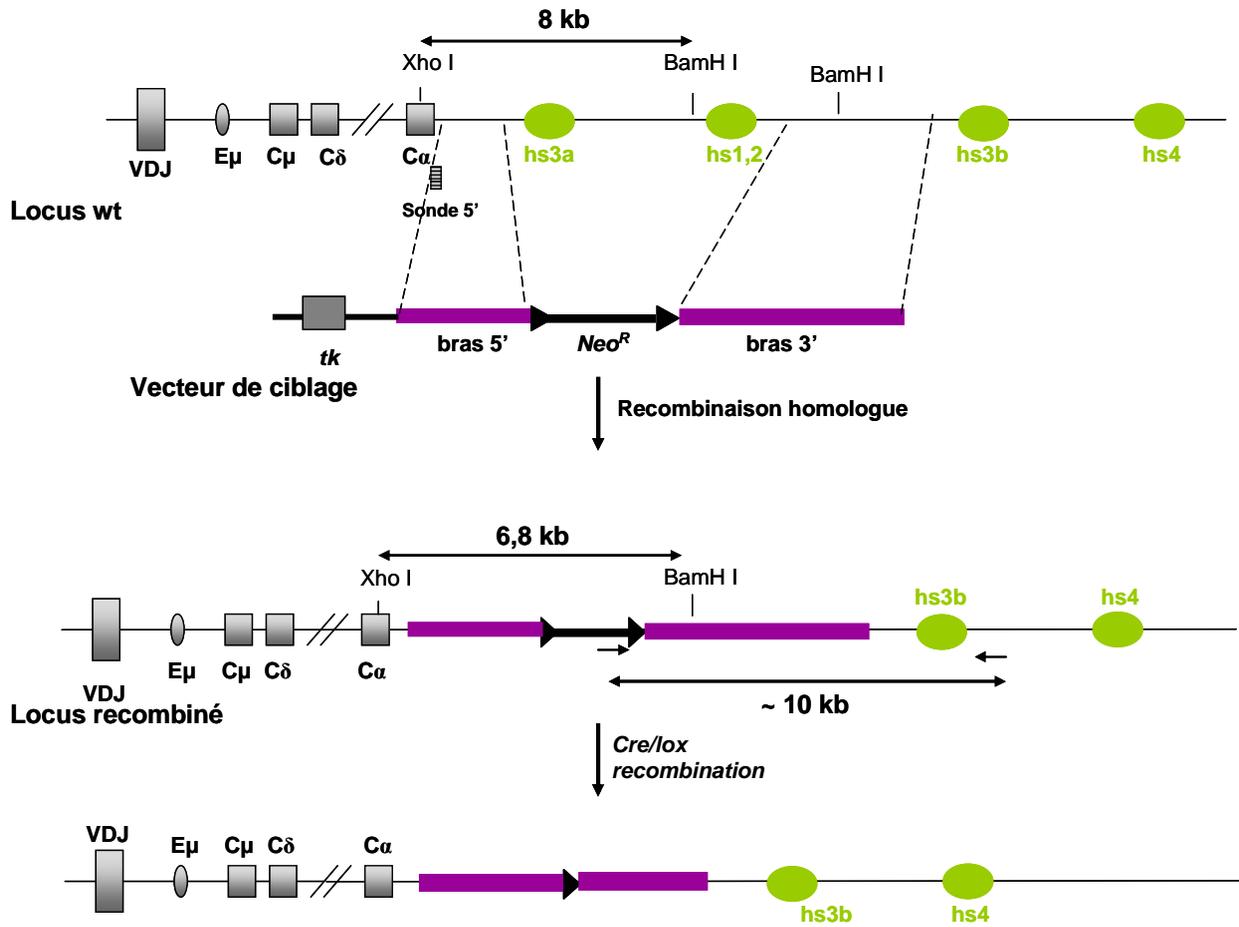
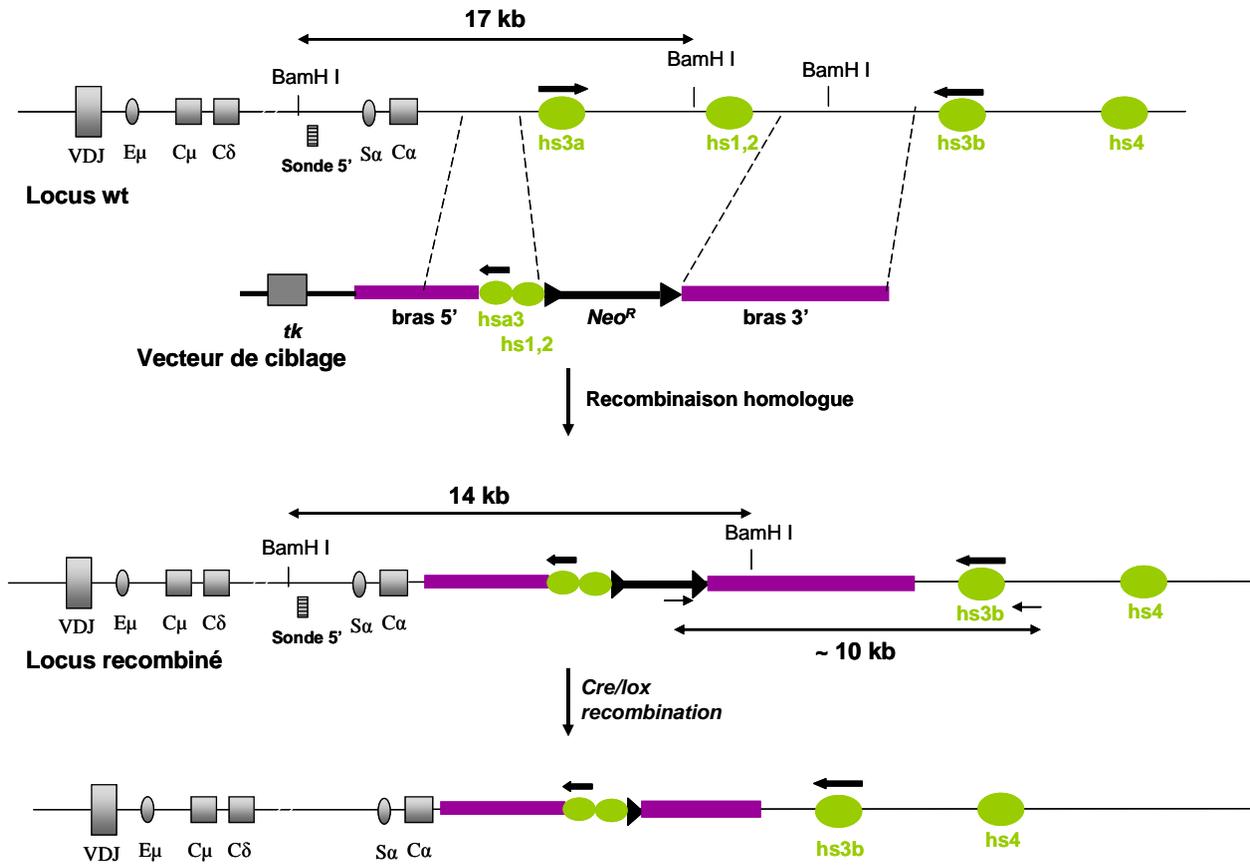


Schéma de la stratégie adoptée pour la délétion conjointe des deux premiers enhancers de la région 3'RR, hs3a et hs1,2.

ANNEXE 3 : KO IRhs3a-hs1,2



*Schéma de la stratégie adoptée pour la délétion des régions répétées inversées situées entre les deux premiers enhanceurs (*hs3a* et *hs1,2*) de la région 3'RR.*

BIBLIOGRAPHIE

- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D. J., Corcoran, A. and Oltz, E. M.** (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol* **176**, 2439-47.
- Aguilera, R. J., Hope, T. J. and Sakano, H.** (1985). Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *Embo J* **4**, 3689-93.
- Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S. P.** (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-13.
- Alessandrini, A. and Desiderio, S. V.** (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol Cell Biol* **11**, 2096-107.
- Amati, B., Alevizopoulos, K. and Vlach, J.** (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci* **3**, d250-68.
- Arulampalam, V., Eckhardt, L. and Pettersson, S.** (1997). The enhancer shift: a model to explain the developmental control of IgH gene expression in B-lineage cells. *Immunol Today* **18**, 549-54.
- Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. and Cleveland, J. L.** (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**, 1915-22.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M. and Olsson, C.** (2001). Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* **166**, 5051-7.
- Banerji, J., Olson, L. and Schaffner, W.** (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**, 729-40.
- Barreto, V., Reina-San-Martin, B., Ramiro, A. R., McBride, K. M. and Nussenzweig, M. C.** (2003). C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell* **12**, 501-8.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J. P., Manis, J. P. and Alt, F. W.** (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* **438**, 508-11.
- Bebin, A. G., Carrion, C., Marquet, M., Cogne, N., Lecardeur, S., Cogne, M. and Pinaud, E.** (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J Immunol* **184**, 3710-7.
- Bemark, M. and Neuberger, M. S.** (2000). The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene* **19**, 3404-10.
- Betz, A. G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T. and Neuberger, M. S.** (1994). Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* **77**, 239-48.
- Blum, K. A., Lozanski, G. and Byrd, J. C.** (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* **104**, 3009-20.

- Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A. et al.** (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* **80**, 813-23.
- Born, T. L., Frost, J. A., Schonthal, A., Prendergast, G. C. and Feramisco, J. R.** (1994). c-Myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter. *Mol Cell Biol* **14**, 5710-8.
- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P. and Alt, F. W.** (1994). S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *Embo J* **13**, 665-74.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F. and Alt, F. W.** (1998). Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int Immunol* **10**, 799-806.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M. D. and Goodman, M. F.** (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4102-7.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M. C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J. L., Hufnagel, M., le Deist, F. et al.** (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-99.
- Canelles, M., Delgado, M. D., Hyland, K. M., Lerga, A., Richard, C., Dang, C. V. and Leon, J.** (1997). Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene* **14**, 1315-27.
- Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X. F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K. et al.** (1998). Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *Embo J* **17**, 2404-11.
- Catalan, N., Selz, F., Imai, K., Revy, P., Fischer, A. and Durandy, A.** (2003). The block in immunoglobulin class switch recombination caused by activation-induced cytidine deaminase deficiency occurs prior to the generation of DNA double strand breaks in switch mu region. *J Immunol* **171**, 2504-9.
- Cesarman, E., Dalla-Favera, R., Bentley, D. and Groudine, M.** (1987). Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma. *Science* **238**, 1272-5.
- Chakraborty, T., Perlot, T., Subrahmanyam, R., Jani, A., Goff, P. H., Zhang, Y., Ivanova, I., Alt, F. W. and Sen, R.** (2009). A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J Exp Med* **206**, 1019-27.
- Chaudhuri, J. and Alt, F. W.** (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* **4**, 541-52.
- Chaudhuri, J., Khuong, C. and Alt, F. W.** (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* **430**, 992-8.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. and Alt, F. W.** (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* **422**, 726-30.

- Chauveau, C. and Cogne, M.** (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet* **14**, 15-6.
- Chauveau, C., Pinaud, E. and Cogne, M.** (1998). Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur J Immunol* **28**, 3048-56.
- Chen, C. and Birshtein, B. K.** (1997). Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J Immunol* **159**, 1310-8.
- Chen, X., Kinoshita, K. and Honjo, T.** (2001). Variable deletion and duplication at recombination junction ends: implication for staggered double-strand cleavage in class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13860-5.
- Cheung, W. C., Kim, J. S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R. D. and Janz, S.** (2004). Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest* **113**, 1763-73.
- Cogne, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H. L. and Alt, F. W.** (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* **77**, 737-47.
- Corcoran, M. M., Mould, S. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Chapman, R. M., Boright, A. P., Platt, C., Tsui, L. C., Scherer, S. W. and Oscier, D. G.** (1999). Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* **18**, 6271-7.
- Cowling, V. H., Chandriani, S., Whitfield, M. L. and Cole, M. D.** (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* **26**, 4226-39.
- Daksis, J. I., Lu, R. Y., Facchini, L. M., Marhin, W. W. and Penn, L. J.** (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* **9**, 3635-45.
- Dang, C. V.** (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**, 1-11.
- Dariavach, P., Williams, G. T., Campbell, K., Pettersson, S. and Neuberger, M. S.** (1991). The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur J Immunol* **21**, 1499-504.
- Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R. and Bradley, A.** (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* **7**, 671-82.
- Delphin, S. and Stavnezer, J.** (1995). Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J Exp Med* **181**, 181-92.
- Dempsey, L. A., Sun, H., Hanakahi, L. A. and Maizels, N.** (1999). G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *J Biol Chem* **274**, 1066-71.

- Denizot, Y., Pinaud, E., Aupetit, C., Le Morvan, C., Magnoux, E., Aldigier, J. C. and Cogne, M.** (2001). Polymorphism of the human alpha1 immunoglobulin gene 3' enhancer hs1,2 and its relation to gene expression. *Immunology* **103**, 35-40.
- Di Noia, J. M. and Neuberger, M. S.** (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* **76**, 1-22.
- Dickerson, S. K., Market, E., Besmer, E. and Papavasiliou, F. N.** (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med* **197**, 1291-6.
- Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F.** (1987). The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *Embo J* **6**, 1685-90.
- Dudley, D. D., Chaudhuri, J., Bassing, C. H. and Alt, F. W.** (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* **86**, 43-112.
- Dunnick, W., Hertz, G. Z., Scappino, L. and Gritzmacher, C.** (1993). DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* **21**, 365-72.
- Dunnick, W. A., Collins, J. T., Shi, J., Westfield, G., Fontaine, C., Hakimpour, P. and Papavasiliou, F. N.** (2009). Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J Exp Med* **206**, 2613-23.
- Dunnick, W. A., Shi, J., Graves, K. A. and Collins, J. T.** (2005). The 3' end of the heavy chain constant region locus enhances germline transcription and switch recombination of the four gamma genes. *J Exp Med* **201**, 1459-66.
- Eaton, S. and Calame, K.** (1987). Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7634-8.
- Ernst, P. and Smale, S. T.** (1995). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* **2**, 427-38.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. and Hancock, D. C.** (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-28.
- Fukita, Y., Jacobs, H. and Rajewsky, K.** (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* **9**, 105-14.
- Galaktionov, K., Chen, X. and Beach, D.** (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**, 511-7.
- Garrett, F. E., Emelyanov, A. V., Sepulveda, M. A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L. A., Lobanenko, V. V. and Birshtein, B. K.** (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* **25**, 1511-25.
- Giambra, V., Volpi, S., Emelyanov, A. V., Pflugh, D., Bothwell, A. L., Norio, P., Fan, Y., Ju, Z., Skoultchi, A. I., Hardy, R. R. et al.** (2008). Pax5 and linker histone H1 coordinate DNA methylation and histone modifications in the 3' regulatory region of the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol Cell Biol* **28**, 6123-33.

- Giannini, S. L., Singh, M., Calvo, C. F., Ding, G. and Birshtein, B. K.** (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J Immunol* **150**, 1772-80.
- Gillies, S. D., Morrison, S. L., Oi, V. T. and Tonegawa, S.** (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* **33**, 717-28.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K. et al.** (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-82.
- Gostissa, M., Yan, C. T., Bianco, J. M., Cogne, M., Pinaud, E. and Alt, F. W.** (2009). Long-range oncogenic activation of Igh-c-myc translocations by the Igh 3' regulatory region. *Nature* **462**, 803-7.
- Grant, P. A., Arulampalam, V., Ahrlund-Richter, L. and Pettersson, S.** (1992). Identification of Ets-like lymphoid specific elements within the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Nucleic Acids Res* **20**, 4401-8.
- Gregor, P. D. and Morrison, S. L.** (1986). Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol Cell Biol* **6**, 1903-16.
- Griep, A. E. and Westphal, H.** (1988). Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6806-10.
- Guglielmi, L., Truffinet, V., Magnoux, E., Cogne, M. and Denizot, Y.** (2004). The polymorphism of the locus control region lying downstream the human IgH locus is restricted to hs1,2 but not to hs3 and hs4 enhancers. *Immunol Lett* **94**, 77-81.
- Hanson, K. D., Shichiri, M., Follansbee, M. R. and Sedivy, J. M.** (1994). Effects of c-myc expression on cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **14**, 5748-55.
- Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A. and Goodnow, C. C.** (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* **72**, 325-35.
- Hayette, S., Tigaud, I., Callet-Bauchu, E., Ffrench, M., Gazzo, S., Wahbi, K., Callanan, M., Felman, P., Dumontet, C., Magaud, J. P. et al.** (2003). In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood* **102**, 1549-50.
- Heckman, C. A., Cao, T., Somsouk, L., Duan, H., Mehew, J. W., Zhang, C. Y. and Boxer, L. M.** (2003). Critical elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancers for deregulated expression of bcl-2. *Cancer Res* **63**, 6666-73.
- Herbst, A., Hemann, M. T., Tworowski, K. A., Salghetti, S. E., Lowe, S. W. and Tansey, W. P.** (2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* **6**, 177-83.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F. et al.** (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2229-34.

- Hertz, M. and Nemazee, D.** (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity* **6**, 429-36.
- Hoang, A. T., Cohen, K. J., Barrett, J. F., Bergstrom, D. A. and Dang, C. V.** (1994). Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6875-9.
- Holt, J. T., Redner, R. L. and Nienhuis, A. W.** (1988). An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* **8**, 963-73.
- Honjo, T.** (1983). Immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* **1**, 499-528.
- Honjo, T., Nagaoka, H., Shinkura, R. and Muramatsu, M.** (2005). AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat Immunol* **6**, 655-61.
- Hu, Y., Pan, Q., Pardali, E., Mills, F. C., Bernstein, R. M., Max, E. E., Sideras, P. and Hammarstrom, L.** (2000). Regulation of germline promoters by the two human Ig heavy chain 3' alpha enhancers. *J Immunol* **164**, 6380-6.
- Jansen-Durr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G. and Eilers, M.** (1993). Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3685-9.
- Janz, S.** (2008). Genetic and environmental cofactors of Myc translocations in plasma cell tumor development in mice. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 37-40.
- Jenuwein, T. and Grosschedl, R.** (1991). Complex pattern of immunoglobulin mu gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities. *Genes Dev* **5**, 932-43.
- Ju, Z., Volpi, S. A., Hassan, R., Martinez, N., Giannini, S. L., Gold, T. and Birshtein, B. K.** (2007). Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J Biol Chem* **282**, 35169-78.
- Jung, S., Rajewsky, K. and Radbruch, A.** (1993). Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* **259**, 984-7.
- Kakkis, E., Mercola, M. and Calame, K.** (1988). Strong transcriptional activation of translocated c-myc genes occurs without a strong nearby enhancer or promoter. *Nucleic Acids Res* **16**, 77-96.
- Kaplan, M. H., Zong, R. T., Herrscher, R. F., Scheuermann, R. H. and Tucker, P. W.** (2001). Transcriptional activation by a matrix associating region-binding protein. contextual requirements for the function of b1gHt. *J Biol Chem* **276**, 21325-30.
- Kenter, A. L.** (2003). Class-switch recombination: after the dawn of AID. *Curr Opin Immunol* **15**, 190-8.
- Khamlichi, A. A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M. and Cogne, M.** (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* **103**, 3828-36.
- Klein, S., Sablitzky, F. and Radbruch, A.** (1984). Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *Embo J* **3**, 2473-6.

- Komori, A., Xu, Z., Wu, X., Zan, H. and Casali, P.** (2006). Biased dA/dT somatic hypermutation as regulated by the heavy chain intronic iEmu enhancer and 3'Ealpha enhancers in human lymphoblastoid B cells. *Mol Immunol* **43**, 1817-26.
- Kotani, A., Kakazu, N., Tsuruyama, T., Okazaki, I. M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Nagaoka, H., Yabe, D. and Honjo, T.** (2007). Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1616-20.
- Kottmann, A. H., Zevnik, B., Welte, M., Nielsen, P. J. and Kohler, G.** (1994). A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur J Immunol* **24**, 817-21.
- Kozar, K. and Sicinski, P.** (2005). Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell Cycle* **4**, 388-91.
- Kuppers, R.** (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 251-62.
- Kuppers, R. and Dalla-Favera, R.** (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**, 5580-94.
- Kuzin, Il, Ugine, G. D., Wu, D., Young, F., Chen, J. and Bottaro, A.** (2000). Normal isotype switching in B cells lacking the I mu exon splice donor site: evidence for multiple I mu-like germline transcripts. *J Immunol* **164**, 1451-7.
- Laurencikiene, J., Tamosiunas, V. and Severinson, E.** (2007). Regulation of epsilon germline transcription and switch region mutations by IgH locus 3' enhancers in transgenic mice. *Blood* **109**, 159-67.
- LeBowitz, J. H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D. and Sharp, P. A.** (1988). Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev* **2**, 1227-37.
- Lee, C. G., Kinoshita, K., Arudchandran, A., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J. and Honjo, T.** (2001). Quantitative regulation of class switch recombination by switch region transcription. *J Exp Med* **194**, 365-74.
- Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K. and Hardy, R. R.** (1996). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527-35.
- Lieberson, R., Giannini, S. L., Birshtein, B. K. and Eckhardt, L. A.** (1991). An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res* **19**, 933-7.
- Longerich, S., Tanaka, A., Bozek, G., Nicolae, D. and Storb, U.** (2005). The very 5' end and the constant region of Ig genes are spared from somatic mutation because AID does not access these regions. *J Exp Med* **202**, 1443-54.
- Luby, T. M., Schrader, C. E., Stavnezer, J. and Selsing, E.** (2001). The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J Exp Med* **193**, 159-68.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and Lieber, M. R.** (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781-94.

- Madisen, L. and Groudine, M.** (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev* **8**, 2212-26.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P. and Barbacid, M.** (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504.
- Manis, J. P., Dudley, D., Kaylor, L. and Alt, F. W.** (2002). IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity* **16**, 607-17.
- Manis, J. P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K. and Alt, F. W.** (1998a). Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J Exp Med* **187**, 2081-9.
- Manis, J. P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A. and Alt, F. W.** (1998b). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* **188**, 1421-31.
- Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J. M., Jager, U., McBlane, F. and Nadel, B.** (2006). Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1246-58.
- Marzec, M., Kasprzycka, M., Lai, R., Gladden, A. B., Wlodarski, P., Tomczak, E., Nowell, P., Deprimo, S. E., Sadis, S., Eck, S. et al.** (2006). Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood* **108**, 1744-50.
- Mason, J. O., Williams, G. T. and Neuberger, M. S.** (1985). Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* **41**, 479-87.
- Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S. and Sedivy, J. M.** (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* **8**, 1039-48.
- Matthias, P. and Baltimore, D.** (1993). The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol Cell Biol* **13**, 1547-53.
- McBride, K. M., Gazumyan, A., Woo, E. M., Barreto, V. M., Robbiani, D. F., Chait, B. T. and Nussenzweig, M. C.** (2006). Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8798-803.
- McBride, K. M., Gazumyan, A., Woo, E. M., Schwickert, T. A., Chait, B. T. and Nussenzweig, M. C.** (2008). Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J Exp Med* **205**, 2585-94.
- Meek, K. D., Hasemann, C. A. and Capra, J. D.** (1989). Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. Inversions and fusions add to IgH somatic diversity. *J Exp Med* **170**, 39-57.
- Melamed, D. and Nemazee, D.** (1997). Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9267-72.

- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B. and Rolink, A.** (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* **14**, 60-8.
- Michaelson, J. S., Giannini, S. L. and Birshtein, B. K.** (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res* **23**, 975-81.
- Mills, F. C., Harindranath, N., Mitchell, M. and Max, E. E.** (1997). Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J Exp Med* **186**, 845-58.
- Milstein, C., Neuberger, M. S. and Staden, R.** (1998). Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8791-4.
- Mo, H., Vita, M., Crespin, M. and Henriksson, M.** (2006). Myc overexpression enhances apoptosis induced by small molecules. *Cell Cycle* **5**, 2191-4.
- Mocikat, R., Harloff, C. and Kutemeier, G.** (1993). The effect of the rat immunoglobulin heavy-chain 3' enhancer is position dependent. *Gene* **136**, 349-53.
- Mocikat, R., Kardinal, C. and Klobeck, H. G.** (1995). Differential interactions between the immunoglobulin heavy chain mu intron and 3' enhancer. *Eur J Immunol* **25**, 3195-8.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V. E.** (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-77.
- Morvan, C. L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A. and Cogne, M.** (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* **102**, 1421-7.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T.** (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-63.
- Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N. A. and Honjo, T.** (2007). Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. *Adv Immunol* **94**, 1-36.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. and Honjo, T.** (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**, 18470-6.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C. G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y. and Shimizu, A.** (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* **302**, 2137-40.
- Neuberger, M. S.** (2008). Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol* **86**, 124-32.
- Neuberger, M. S. and Calabi, F.** (1983). Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature* **305**, 240-3.
- Neuberger, M. S., Harris, R. S., Di Noia, J. and Petersen-Mahrt, S. K.** (2003). Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* **28**, 305-12.

- Nijnik, A., Dawson, S., Crockford, T. L., Woodbine, L., Visetnoi, S., Bennett, S., Jones, M., Turner, G. D., Jeggo, P. A., Goodnow, C. C. et al.** (2009). Impaired lymphocyte development and antibody class switching and increased malignancy in a murine model of DNA ligase IV syndrome. *J Clin Invest* **119**, 1696-705.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V.** (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**, 1510-2.
- Nitschke, L., Kestler, J., Tallone, T., Pelkonen, S. and Pelkonen, J.** (2001). Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J Immunol* **166**, 2540-52.
- Norvell, A., Mandik, L. and Monroe, J. G.** (1995). Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol* **154**, 4404-13.
- Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M. C. and Li, G. C.** (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* **382**, 551-5.
- Odegard, V. H. and Schatz, D. G.** (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* **6**, 573-83.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. and Baltimore, D.** (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517-23.
- Ong, J., Stevens, S., Roeder, R. G. and Eckhardt, L. A.** (1998). 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J Immunol* **160**, 4896-903.
- Park, S. S., Kim, J. S., Tessarollo, L., Owens, J. D., Peng, L., Han, S. S., Tae Chung, S., Torrey, T. A., Cheung, W. C., Polakiewicz, R. D. et al.** (2005a). Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* **65**, 1306-15.
- Park, S. S., Shaffer, A. L., Kim, J. S., duBois, W., Potter, M., Staudt, L. M. and Janz, S.** (2005b). Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res* **65**, 7644-52.
- Parslow, T. G., Blair, D. L., Murphy, W. J. and Granner, D. K.** (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2650-4.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R. and Dalla-Favera, R.** (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341-6.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. and Bonner, W. M.** (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**, 886-95.
- Pawlitzky, I., Angeles, C. V., Siegel, A. M., Stanton, M. L., Riblet, R. and Brodeur, P. H.** (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J Immunol* **176**, 6839-51.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R. M., Nemazee, D. and Rajewsky, K.** (1997). Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* **7**, 765-75.

- Perlot, T., Alt, F. W., Bassing, C. H., Suh, H. and Pinaud, E.** (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14362-7.
- Perlot, T., Li, G. and Alt, F. W.** (2008). Antisense transcripts from immunoglobulin heavy-chain locus V(D)J and switch regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3843-8.
- Peters, A. and Storb, U.** (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* **4**, 57-65.
- Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S. and Neuberger, M. S.** (2002). AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* **418**, 99-103.
- Petersen-Mahrt, S. K. and Neuberger, M. S.** (2003). In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1). *J Biol Chem* **278**, 19583-6.
- Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Difilippantonio, M. J., Wilson, P. C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D. R. et al.** (2001). AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* **414**, 660-5.
- Pettersson, S., Cook, G. P., Bruggemann, M., Williams, G. T. and Neuberger, M. S.** (1990). A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* **344**, 165-8.
- Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L. M. and Wirth, T.** (1994). Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *Embo J* **13**, 1654-63.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J. and Goodman, M. F.** (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* **424**, 103-7.
- Pierani, A., Heguy, A., Fujii, H. and Roeder, R. G.** (1990). Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol Cell Biol* **10**, 6204-15.
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C. and Cogne, M.** (1997). Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur J Immunol* **27**, 2981-5.
- Pinaud, E., Khamlichi, A. A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M. and Cogne, M.** (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187-99.
- Prochownik, E. V. and Kukowska, J.** (1986). Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* **322**, 848-50.
- Prochownik, E. V., Kukowska, J. and Rodgers, C.** (1988). c-myc antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G1 progression in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **8**, 3683-95.
- Rabbitts, T. H., Hamlyn, P. H. and Baer, R.** (1983). Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* **306**, 760-5.

- Rada, C., Di Noia, J. M. and Neuberger, M. S.** (2004). Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* **16**, 163-71.
- Ramachandran, S., Chahwan, R., Nepal, R. M., Frieder, D., Panier, S., Roa, S., Zaheen, A., Durocher, D., Scharff, M. D. and Martin, A.** (2010). The RNF8/RNF168 ubiquitin ligase cascade facilitates class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 809-14.
- Ramiro, A., San-Martin, B. R., McBride, K., Jankovic, M., Barreto, V., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C.** (2007). The role of activation-induced deaminase in antibody diversification and chromosome translocations. *Adv Immunol* **94**, 75-107.
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C.** (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118**, 431-8.
- Ramiro, A. R., Stavropoulos, P., Jankovic, M. and Nussenzweig, M. C.** (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol* **4**, 452-6.
- Rane, S. G., Dubus, P., Mettus, R. V., Galbreath, E. J., Boden, G., Reddy, E. P. and Barbacid, M.** (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* **22**, 44-52.
- Revy, P., Buck, D., le Deist, F. and de Villartay, J. P.** (2005). The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. *Adv Immunol* **87**, 237-95.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeolouse, R., Gennery, A. et al.** (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565-75.
- Rivera-Munoz, P., Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Abramowski, V., Bruneau, S., Fischer, A., Paques, F. and de Villartay, J. P.** (2009). Reduced immunoglobulin class switch recombination in the absence of Artemis. *Blood* **114**, 3601-9.
- Robbiani, D. F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D. J., Chen, H. T., Corcoran, A. E., Nussenzweig, A. et al.** (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* **135**, 1028-38.
- Ryan, K. M. and Birnie, G. D.** (1996). Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* **314** (Pt 3), 713-21.
- Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B. P. and Alt, F. W.** (1999). Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1526-31.
- Saleque, S., Singh, M. and Birshtein, B. K.** (1999). Ig heavy chain expression and class switching in vitro from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3A and hs1,2. *J Immunol* **162**, 2791-803.

- Saleque, S., Singh, M., Little, R. D., Giannini, S. L., Michaelson, J. S. and Birshtein, B. K.** (1997). Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J Immunol* **158**, 4780-7.
- Santamaria, D. and Ortega, S.** (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* **11**, 1164-88.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. and Baltimore, D.** (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035-48.
- Schlissel, M. S.** (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* **3**, 890-9.
- Sekiguchi, J. M. and Ferguson, D. O.** (2006). DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* **124**, 260-2.
- Serwe, M. and Sablitzky, F.** (1993). V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *Embo J* **12**, 2321-7.
- Shen, H. M. and Storb, U.** (2004). Activation-induced cytidine deaminase (AID) can target both DNA strands when the DNA is supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12997-3002.
- Shen, H. M., Tanaka, A., Bozek, G., Nicolae, D. and Storb, U.** (2006). Somatic hypermutation and class switch recombination in Msh6(-/-)Ung(-/-) double-knockout mice. *J Immunol* **177**, 5386-92.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. et al.** (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-67.
- Shinkura, R., Ito, S., Begum, N. A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H. and Honjo, T.** (2004). Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* **5**, 707-12.
- Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y. and Alt, F. W.** (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol* **4**, 435-41.
- Sotillo, R., Dubus, P., Martin, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M.** (2001). Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *Embo J* **20**, 6637-47.
- Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Olivier-Martin, C., Goujet-Zalc, C., Charneau, P. and de Villartay, J. P.** (2007). Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* **204**, 1717-27.
- Stavnezer, J.** (1995). Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *J Immunol* **155**, 1647-51.
- Stavnezer, J.** (2000). Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 127-68.
- Steele, E. J.** (2009). Mechanism of somatic hypermutation: critical analysis of strand biased mutation signatures at A:T and G:C base pairs. *Mol Immunol* **46**, 305-20.

- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J. and Eilers, M.** (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J* **14**, 4814-26.
- Ta, V. T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S. et al.** (2003). AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* **4**, 843-8.
- Taccioli, G. E., Cheng, H. L., Varghese, A. J., Whitmore, G. and Alt, F. W.** (1994). A DNA repair defect in Chinese hamster ovary cells affects V(D)J recombination similarly to the murine scid mutation. *J Biol Chem* **269**, 7439-42.
- Tashiro, J., Kinoshita, K. and Honjo, T.** (2001). Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int Immunol* **13**, 495-505.
- Taub, R., Moulding, C., Battey, J., Murphy, W., Vasicek, T., Lenoir, G. M. and Leder, P.** (1984). Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in burkitt lymphoma cells. *Cell* **36**, 339-48.
- Thoger Andersen, A. S., Jensen, A. W., Grant, P., Arulampalam, V., Pettersson, S. and Junker, S.** (1997). Concomitant downregulation of IgH 3' enhancer activity and c-myc expression in a plasmacytoma x fibroblast environment: implications for dysregulation of translocated c-myc. *Mol Immunol* **34**, 97-107.
- Thompson, A., Timmers, E., Schuurman, R. K. and Hendriks, R. W.** (1995). Immunoglobulin heavy chain germ-line JH-C mu transcription in human precursor B lymphocytes initiates in a unique region upstream of DQ52. *Eur J Immunol* **25**, 257-61.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M. and Nemazee, D.** (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* **177**, 1009-20.
- Tonegawa, S.** (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-81.
- Truffinet, V., Pinaud, E., Cogne, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogne, M. and Denizot, Y.** (2007). The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol* **179**, 6033-42.
- Tsukada, S., Sugiyama, H., Oka, Y. and Kishimoto, S.** (1990). Estimation of D segment usage in initial D to JH joinings in a murine immature B cell line. Preferential usage of DFL16.1, the most 5' D segment and DQ52, the most JH-proximal D segment. *J Immunol* **144**, 4053-9.
- Tumas-Brundage, K. M., Vora, K. A. and Manser, T.** (1997). Evaluation of the role of the 3'alpha heavy chain enhancer [3'alpha E(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol Immunol* **34**, 367-78.
- Vilen, B. J., Famiglietti, S. J., Carbone, A. M., Kay, B. K. and Cambier, J. C.** (1997). B cell antigen receptor desensitization: disruption of receptor coupling to tyrosine kinase activation. *J Immunol* **159**, 231-43.
- Vita, M. and Henriksson, M.** (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 318-30.

- Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D. and Amati, B.** (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* **15**, 6595-604.
- Wabl, M. R. and Burrows, P. D.** (1984). Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2452-5.
- Wang, J. and Boxer, L. M.** (2005). Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J Biol Chem* **280**, 12766-73.
- Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A. A. and Kenter, A. L.** (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J Exp Med* **206**, 1817-30.
- Warren, W. D. and Berton, M. T.** (1995). Induction of germ-line gamma 1 and epsilon Ig gene expression in murine B cells. IL-4 and the CD40 ligand-CD40 interaction provide distinct but synergistic signals. *J Immunol* **155**, 5637-46.
- Wirth, T., Staudt, L. and Baltimore, D.** (1987). An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature* **329**, 174-8.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H. and Beach, D.** (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281-4.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F. W., Cogne, M., Pinaud, E. and Kenter, A. L.** (2007). S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* **27**, 711-22.
- Wuerffel, R. A., Du, J., Thompson, R. J. and Kenter, A. L.** (1997). Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol* **159**, 4139-44.
- Xu, M. Z. and Stavnezer, J.** (1992). Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *Embo J* **11**, 145-55.
- Xue, K., Rada, C. and Neuberger, M. S.** (2006). The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in msh2^{-/-} ung^{-/-} mice. *J Exp Med* **203**, 2085-94.
- Yan, C. T., Boboila, C., Souza, E. K., Franco, S., Hickernell, T. R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A. A., Manis, J. P. et al.** (2007a). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449**, 478-82.
- Yan, Y., Park, S. S., Janz, S. and Eckhardt, L. A.** (2007b). In a model of immunoglobulin heavy-chain (IGH)/MYC translocation, the Igh 3' regulatory region induces MYC expression at the immature stage of B cell development. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 950-9.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R. et al.** (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**, 1688-702.

- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E. and Lieber, M. R.** (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol* **4**, 442-51.
- Zaller, D. M. and Eckhardt, L. A.** (1985). Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5088-92.
- Zarrin, A. A., Goff, P. H., Senger, K. and Alt, F. W.** (2008). Sgamma3 switch sequences function in place of endogenous Sgamma1 to mediate antibody class switching. *J Exp Med* **205**, 1567-72.
- Zhang, J., Bottaro, A., Li, S., Stewart, V. and Alt, F. W.** (1993). A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *Embo J* **12**, 3529-37.
- Zhu, C., Bogue, M. A., Lim, D. S., Hasty, P. and Roth, D. B.** (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* **86**, 379-89.
- Zong, R. T., Das, C. and Tucker, P. W.** (2000). Regulation of matrix attachment region-dependent, lymphocyte-restricted transcription through differential localization within promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Embo J* **19**, 4123-33.

***VALORISATION DES
COMPETENCES
«LE NOUVEAU CHAPITRE DE LA
THESE»***

I. CONTEXTE ET ENJEUX DE LA THESE

Le système immunitaire est un système de défense remarquable qui existe chez de très nombreux organismes mais dont la forme la plus évoluée est retrouvée chez les vertébrés supérieurs. Il consiste en un ensemble de moyens (organes, tissus, cellules et molécules) permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui est propre (les antigènes du soi) mais aussi de reconnaître et rejeter ce qui lui est étranger (les antigènes du non-soi). Cette fonction permet ainsi d'assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes (d'origine bactérienne, virale ou parasitaire) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. A l'intérieur de ce système de protection, la réponse immunitaire humorale repose sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines (Ig) ou anticorps et produites par les cellules de la lignée lymphocytaire B. Ces molécules sont capables de lier spécifiquement un antigène en vue de le neutraliser ou de l'éliminer.

Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques, d'environ 150 kDa, exprimées à la surface des lymphocytes B ou excrétées par les plasmocytes. Elles sont composées de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques et deux chaînes légères (L pour Light) identiques. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène tandis que les domaines constants des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline. La plupart des vertébrés possèdent deux types de chaînes légères, appelés κ et λ , qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chez la souris, les IgG sont subdivisées en sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

La maturation lymphocytaire B est rendue complexe par l'existence d'un programme d'activation génique contrôlant la transcription des gènes d'immunoglobulines (Ig) et leur accessibilité à des remaniements majeurs par recombinaison ou mutation. Un premier répertoire d'Ig est établi par le phénomène de recombinaison V(D)J suivi d'une diversification secondaire, réalisée dans les cellules B matures, faisant appel aux recombinaisons de commutation de classe (ou *switch*) et à l'hypermutation somatique des régions V. Tous ces évènements sont contrôlés par des éléments régulateurs non seulement en 5' mais également en 3' des gènes codant les chaînes lourdes des Ig (locus IgH). En 3' du locus IgH sont localisés 4 éléments régulateurs de la transcription qui possèdent une architecture qui semble stratégique (structure palindromique des trois premiers éléments régulateurs). Cette région a été qualifiée de Région Contrôle de Locus ou 3'LCR. Ce sont

des sites d'hypersensibilité à la DNase I d'où leurs noms : HS3a, HS1,2, HS3b et HS4. Ce palindrome est centré sur le site HS1,2 avec, de part et d'autres, des régions répétées inversées (IR) dont les extrémités sont formées par HS3a et HS3b, deux éléments fortement homologues et orientés de manière opposée. Peu de données sont à notre disposition pour comprendre le rôle de la 3'LCR dans cette maturation. Quelques résultats suggèrent son rôle lors des processus de recombinaison VDJ, de l'hypermutation somatique et de la recombinaison isotypique. Ainsi, la délétion conjointe des deux derniers éléments (hs3b et hs4) montre un défaut dans la commutation isotypique B suggérant un rôle de la 3'LCR lors des cassures chromosomiques conduisant au *switch*. Un rôle de la 3'LCR a été également montré lors de l'hypermutation somatique qui aboutit à l'ouverture de l'ADN génomique et à l'excision aléatoire de certaines bases pour augmenter le répertoire antigénique. Très récemment, il a été montré une interaction physique entre les régions VDJ et la 3'LCR mais aussi entre le promoteur de *c-myc* et la 3'LCR dans des lignées de Burkitt.

La thématique du laboratoire UMR CNRS 6101 s'inscrit dans l'étude de la physiologie de la réponse immune afin de mieux comprendre le passage d'une cellule à un état pathologique. Le lymphome B (cancer des cellules B) est une prolifération monoclonale massive d'une cellule B qui est bloquée à un stade précis de maturation. La majorité des lymphomes B sont matures et proviennent de cellules issues des centres germinatifs ou post-centres germinatifs. La plupart des lymphomes B matures portent les stigmates de réarrangements chromosomiques accidentels (translocations) qui amènent un oncogène au sein des loci IgH ou IgL. L'expression de cet oncogène passe alors sous le contrôle des éléments *cis*-régulateurs qui sont actifs dans ces loci, notamment la 3'LCR. L'oncogène est alors plus fortement exprimé que dans une cellule saine et de façon non régulée, favorisant ainsi la transformation tumorale de la cellule, et l'apparition d'un clone malin (Figure 1). Le locus IgH, remodelé tout au long du développement B (réarrangement des segments de région variable VDJ, hypermutation somatique, commutation de classe), est donc une zone critique pour les évènements de translocations. Le phénotype mature de ces lymphomes et les cinétiques d'activation différents des activateurs 5' (précoce) et 3' (tardif) du locus IgH suggèrent un rôle prépondérant des éléments de la région 3'RR dans cette surexpression oncogénique.

L'objectif de mon équipe est de comprendre la fonction physiologique de cette région régulatrice pour mieux appréhender son rôle dans un contexte pathologique (lors d'apparition de cancer). Les progrès à venir dans le traitement de ces cancers vont provenir, en grande partie, d'une meilleure connaissance de leur mécanisme de développement. Ceux-ci pourront notamment bénéficier de la compréhension des processus qui participent à

la régulation du locus IgH puisque c'est lui qui intervient dans la forte expression des oncogènes transloqués. Le but de mon projet est d'obtenir une collection de lignées murines portant des délétions plus ou moins longues de la 3'LCR pour mieux comprendre le rôle de celle-ci dans les étapes critiques de la maturation B, lieux potentiels de translocations chromosomiques et d'initiation de la lymphomagenèse.

II. DEROULEMENT ET GESTION DE LA THESE

A mon arrivée au laboratoire, mon projet de thèse débutait. Mon groupe de projet est constitué de mon directeur de thèse Yves DENIZOT et du directeur du laboratoire Michel COGNE. Nous nous réunissions régulièrement pour faire un bilan des avancées scientifiques du sujet, discuter des futures étapes pour mener à bien ce projet. Mon directeur de thèse fut disponible à tout moment pour me conseiller dans l'avancée de ma thèse.

De plus, j'ai également bénéficié de l'aide technique plus ponctuelle d'une technicienne CNRS et de deux animalières.

Au cours de ma thèse, j'ai pu encadrer des étudiants de diverses formations (IUT, Master 1^{ère} et 2^{ème} année, BTS). Ces étudiants ont été des acteurs dynamiques de mon projet et m'ont aidé à l'avancer correctement.

L'objectif de ma thèse était d'étudier par une approche transgénique (modèle murin) le rôle potentiel d'une région régulatrice sur la synthèse d'immunoglobuline. Il existe plusieurs étapes pour créer un modèle transgénique :

- Etude bibliographique et l'élaboration de la stratégie pour créer un vecteur (ADN que l'on veut intégrer chez la souris) ;
- Réalisation de ce vecteur : on fait alors appel à des techniques de biologie moléculaire (PCR, clonage, séquençage, digestions enzymatiques, purification d'ADN plasmidique) ;
- Transfection du vecteur dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES). On passe alors à des techniques de culture cellulaire ;
- Sélection des clones ES possédant la modification génétique ;
- Injection des clones ES recombinants dans des blastocystes de souris en vue de l'obtention de souris chimériques ;
- Croisement des souris chimériques entre elles afin de décliner une lignée transgénique portant la modification génétique voulue.

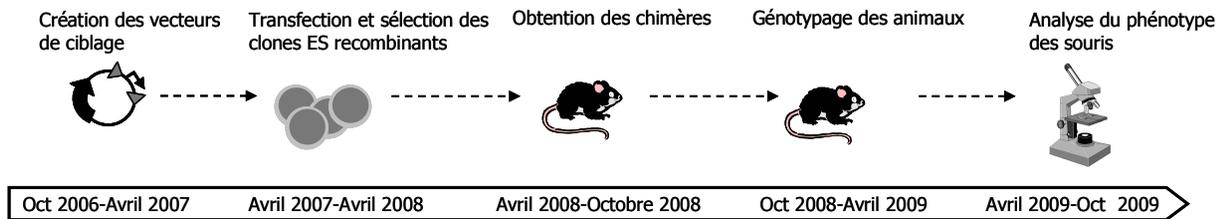


Figure 2 : Schéma des différentes étapes de ma thèse.

➤ Etude bibliographique et création des vecteurs de ciblage

Les deux premiers mois de la thèse ont été consacrés à une étude bibliographique et à l'élaboration des stratégies pour la réalisation des vecteurs (1^{ère} étape pour créer un modèle transgénique). Un vecteur est une molécule d'ADN circulaire capable de se multiplier lui-même dans n'importe quel organisme, dans lequel on introduit de l'ADN étranger ; ce vecteur étant ensuite utilisé pour faire pénétrer cet ADN dans une cellule hôte. C'est en quelque sorte « un moyen de locomotion » qui permet de modifier l'ADN. Un vecteur de knock-out doit posséder des bras dits 5' et 3' (régions homologues en amont et en aval de la région que l'on veut enlever qui vont permettre, un échange entre le vecteur et l'ADN de cellules). Pour cela, on regarde dans les banques de données chez la souris, les séquences déposées afin de sélectionner deux régions à cloner dans le vecteur. Entre ces deux régions, il faut mettre un gène de résistance à la Néomycine. Ce gène va remplacer la partie que l'on veut enlever lors de l'échange d'ADN qui se réalise dans les cellules. Ce gène nous permet également de sélectionner les clones qui ont intégré le vecteur. Nous verrons plus tard pourquoi. Afin de réaliser une deuxième sélection nous ajoutons à ce vecteur un autre gène de sélection : le gène TK. Nous expliquerons son utilité plus tard. Il a fallu 6 mois pour créer les deux vecteurs. J'ai utilisé de nombreuses techniques de biologie moléculaire (PCR, clonage bactérien, purification de vecteur, digestion par des enzymes de restriction, séquençage, ...).

➤ Transfection des cellules ES (cellules souches embryonnaires) et sélection

Une fois les vecteurs obtenus, je suis passée à l'étape de culture cellulaire dans les cellules ES. Cette étape consiste à mettre en présence le vecteur et les cellules ES afin de modifier l'ADN des cellules. Un choc électrique permet de perméabiliser les cellules et ainsi d'intégrer le vecteur. Dans certaines des cellules qui ont intégré le vecteur, il va se produire un échange d'ADN : c'est ce que l'on appelle la recombinaison homologue. Les cellules qui ont effectué cette recombinaison possèdent alors le gène Néo, gène de résistance à l'antibiotique Néomycine à la place de la région que nous voulions enlever. L'étape suivante

est la sélection des cellules en présence de l'antibiotique afin de tuer celles qui ne possèdent pas le gène de résistance à l'antibiotique : c'est une sélection positive. Nous disposons également d'un moyen supplémentaire pour sélectionner ces clones : nous utilisons un deuxième antibiotique, le gancyclovir. Comme je l'ai dit plus haut, dans le vecteur nous avons inséré le gène TK. Lorsque ce gène est présent dans les cellules, il les rend sensible à l'action du gancyclovir et les cellules meurent : il s'agit alors d'une sélection négative. Les cellules que nous conserverons seront alors résistantes à la Néomycine et insensible au traitement au gancyclovir (absence du gène TK). Nous criblons ensuite les cellules ES qui ont résisté aux traitements. Cette partie est une étape longue et fastidieuse qui a duré environ un an à un an et demi pour les deux vecteurs.

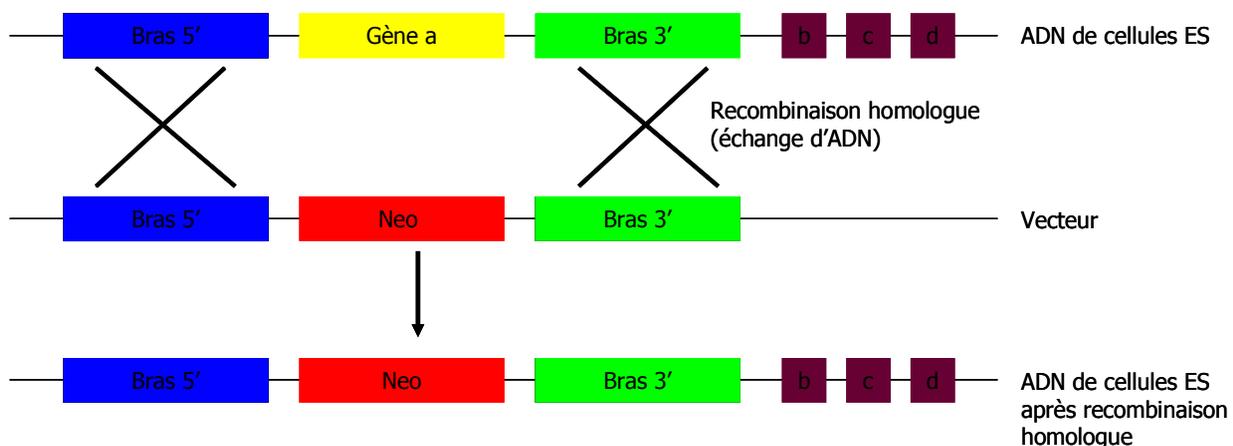


Figure 3 : schéma expliquant la recombinaison homologue. Le gène a (en jaune) est remplacé par le gène Néo (en rouge) lors de la recombinaison homologue.

➤ Création des souris transgéniques et analyse

Les clones positifs sont isolés et injectés dans des blastocystes de souris afin d'obtenir des souris chimériques (à deux couleurs, brun ou agouti qui correspond aux cellules modifiées génétiquement insérés dans les blastocystes et noir qui correspond aux cellules de blastocystes) qui sont ensuite utilisées pour dériver une lignée transgénique. Nous avons pu obtenir des souris chimériques en 9 mois. Ces souris chimériques ne possèdent la modification génétique que sur un allèle : elles sont hétérozygotes. Ces souris sont ensuite croisées entre elles pour obtenir dans la descendance des souris avec la modification sur les deux allèles (elles sont alors homozygotes). De ces souris homozygotes, on développe une lignée de souris porteuse de la modification. Il s'en suit de nombreux tests pour sélectionner les souris mutées puis l'analyse du phénotype de ces souris (analyse

anatomique, morphologique, physiologique). Il faut entre 9 et 12 mois pour réaliser toutes les expériences.

➤ Mise au point de projets supplémentaires

En parallèle de ce sujet, j'ai pu observer de façon concrète les conséquences de l'expression de la région 3'RR dans un contexte de lymphomagenèse. En effet, il a été développé dans le laboratoire un modèle de souris qui démontre que les éléments 3' jouent un rôle dans la dérégulation de l'oncogène c-myc provoquant l'émergence de tumeurs B et mimant le lymphome de Burkitt chez l'Homme. Pour ma part, je me suis plus particulièrement intéressée au statut mutationnel du gène c-myc dérégulé chez ces souris. En effet, pour qu'une cellule normale se transforme en cellule maligne, il faut qu'elle subisse toute une cascade d'évènements anormaux dont des mutations. Le séquençage de c-myc dans ces tumeurs nous a permis de détecter des mutations dans des régions importantes favorisant une forte expression de l'oncogène. Ce travail a permis la publication d'un article.

J'ai également effectué toute l'analyse de souris transgéniques chez lesquelles une partie de la région régulatrice que j'étudie avait été supprimée. Ceci m'a permis de me familiariser avec les différentes techniques utilisées en attendant le développement des mes propre souris. Ce travail s'est finalisé par la publication d'un article.

Le matériel utilisé a été principalement financé par le Ministère de la Recherche, le CNRS, l'Université de Limoges, l'association de Lions Club de Corrèze, la Ligue contre le Cancer. J'ai pu bénéficier de tous les moyens techniques du laboratoire ainsi que ceux des services communs du CHU et de l'Institut Fédératif de Recherche (IFR GEIST 145) dont fait partie le laboratoire : l'animalerie, la plate forme de séquençage, de cytométrie en flux. Afin de réaliser ce projet, j'ai bénéficié pendant trois ans d'une bourse Région. J'ai récemment effectué des demandes de financement pour effectuer une quatrième année : ARC, FRM, ATER et finir ainsi mon projet.

Le budget de ma thèse est de 120606 € pour trois ans (Tableau 1). La plus grosse dépense de ma thèse concerne les consommables. Cette rubrique prend en compte l'achat de fournitures expérimentales : gants, pointes pour pipettes, produits chimiques, milieux de culture cellulaire, seringues, tamis, tubes (1.5 ml, 15 ml, 50 ml), enzymes, anticorps, cytokines, radioactivité, ... Le reste des consommables correspond à des fournitures de bureau (papier, classeurs, crayons, stylos, gommes, toner d'imprimantes, ...).

La deuxième forte dépense concerne la partie « Documentation et communication » ou « Infrastructures ». Nous dépensons beaucoup d'électricité car nous possédons plusieurs

incubateurs et hottes (pour les cultures de cellules ou de bactéries), plusieurs centrifugeuses, plusieurs congélateurs (-80°C, -20° C), réfrigérateurs et chambres froides.

Pendant la thèse, les doctorants ont la possibilité de réaliser des formations diverses organisées à l'Ecole Doctorale. J'ai participé à certaines d'entre elles comme la sensibilisation à l'économie d'entreprise INECO, le management de groupe, le projet professionnel, le « one to one » (réunion régulière avec un anglophone). Ces différentes formations m'ont fait découvrir et enrichir mes connaissances dans des domaines variés.

ESTIMATION DU COUT CONSOLIDE DE LA THESE

Se référer aux règles de calcul avant de compléter le tableau

Montants en euros TTC

	Nature de la dépense	Détails *		Coûts totaux (euros TTC)			
				Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	Ressources Humaines						
1.1	Doctorant	Salaire brut 1658	Charges 667	36	2325	1	56928
1.2	Encadrant 1	Salaire brut 2905	Charges 1162	36	4067	5	20335
1.3	Prime Encadrement						
1.4	Encadrant 2	Salaire brut	Charges				
1.5	Prime Encadrement						
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)	Salaire brut 1848	Charges 739	36	2587	1,5	3880
1.7	Sous-traitance						
	Sous-total Ressources Humaines						
2	Consommables						
2.1	Fournitures expérimentales	850000		36	23611	0,04	34000
2.2	Fournitures de bureau	9600		36	266	0,04	383
2.3	Autres achats						
	Sous-total Consommables						
3	Infrastructures						
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat	900		36	25	0,04	36
3.2	Loyers des locaux	Loyer brut	Charges locatives				
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)	37500		36	1042	0,04	1500
3.4	Autres						
	Sous-total Infrastructures						
4	Matériel (amortissements)						
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement 10	16000	36	444	0,012	192
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement 3	700	36	700	24	467
4.3	Logiciels de bureau	Taux d'amortissement					
4.4	Autre	Taux d'amortissement 10	5000	36	139	0,012	60
	Sous-total Matériel						
5	Déplacements						
5.1	Missions en France	Transport	Hébergement + autres frais				
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				
5.3	Congrès en France	Transport 100	Hébergement + autres frais 400	36	14	0,14	70
5.4	Congrès à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				
	Sous-total Déplacements						
6	Formation						
6.1	Formations	2680		36	74	0,06	161
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)	1044		36	29	1	1044
	Sous-total Formation						
7	Documentation et communication						
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone	37500		36	1041	0,04	1500
7.2	Publicité, communication, impressions	Direct	Sous-traitance agence				
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)		1260	36	35	0,04	50
7.4	Autres						
	Sous-total Documentation et communication						
8	Charges financières (intérêts des emprunts)						
	Sous-total Charges financières						
9	Charges exceptionnelles						
	Sous-total Charges exceptionnelles						
10	TOTAL						120606

* de manière générale, toute dépense d'un montant supérieur à 2 000 euros doit être détaillée

Nature de la recette	Détails *		Coûts totaux (euros TTC)			
			Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
Ministère / Université	411875		36	11441	0,04	16475
Région / CORC	260790		36	7244	0,04	10432
Contrat Européen	176140		36	4893	0,04	7046
Ligue contre le Cancer	250614		36	6961	0,04	10024
CNRS / INSERM	228286		36	6341	0,04	9131
Dons d'Associations	35232		36	979	0,33	10570
Sous-total						63678
Region	56928		36	1581	1	56928
TOTAL						120606

Tableau 1 : Budget de thèse

III. COMPETENCES DEVELOPPEES DANS LE CADRE DU PROJET

➤ Compétences scientifiques

Ces trois années de thèse sont avant tout pour moi une expérience professionnelle majeure. Elles m'ont permis d'acquérir des compétences scientifiques et techniques mais aussi personnelles. Tout d'abord, dans le domaine de la biologie cellulaire, j'ai appris à cultiver des splénocytes (cellules de rate), à les stimuler pour produire des immunoglobulines. J'ai également développé des compétences en biologie moléculaire en utilisant différentes techniques : PCR , clonage, séquençage, Southern Blotting, ... J'ai également appris des techniques biochimiques comme l'ELISA pour mesurer les taux sériques d'immunoglobulines dans le sang de souris. Grâce à des différentes techniques, j'ai ainsi développé une rigueur et une précision dans le geste. En effet, la manipulation de cellules ou de radioactivité, par exemple, demande une grande vigilance afin d'éviter toute contamination.

➤ Compétences organisationnelle et apprenante et gestion de projet

Durant ces trois années, j'ai développé une certaine autonomie ce qui m'a permis de m'organiser (planifier les expériences en vérifiant la disponibilité du matériel) et gérer le temps qui m'était accordé.

Au cours de cette période, j'ai développé d'autres compétences professionnelles non scientifiques. Tout d'abord, j'ai appris à gérer un projet dans un temps demandé. Afin de respecter ce paramètre temporel, il a fallu que j'apprenne à m'organiser, à planifier les expériences, à anticiper les expériences suivantes.

J'ai su maîtriser les risques de mon projet. En accord avec mon directeur de thèse, j'ai réalisé un second projet au cas où mon sujet principal serait dans une impasse et ne soit pas concluant au bout de ces trois années de thèse. J'ai dû alors effectuer une veille bibliographique sur ce nouveau sujet et m'adapter aux types d'expérimentations à effectuer. Il a fallu là aussi faire preuve d'organisation pour mener à bien les deux sujets en parallèle jusqu'à leur terme.

➤ Compétence de communication, de méthode de travail

La thèse m'a également permis de faire évoluer ma personnalité. J'ai tout d'abord su m'intégrer dans une équipe de recherche et travailler avec des personnes de formations diverses. Dans le laboratoire, des chercheurs ou enseignants-chercheurs, ingénieurs, assistants ingénieurs et techniciens se côtoient. J'ai dû ainsi développer des modes de communications différents en fonction du niveau d'étude de chacun. J'ai notamment

beaucoup communiqué avec les animalières. Elles ont toujours été présentes lorsque j'avais besoin de prélèvement de sang et queues de souris.

➤ Compétence d'encadrement

J'ai également eu l'opportunité d'encadrer des étudiants d'IUT, de Master 1 et 2 Recherche ce qui m'a permis d'apprendre à expliquer mon projet avec un langage adapté à la formation de chacun d'entre eux. J'ai su aussi les former aux différentes techniques que j'utilisais. Au fur et à mesure ils ont acquis une certaine autonomie d'expérimentation et il s'est créé une relation de confiance mutuelle. J'ai fait preuve de patience, d'écoute et de pédagogie au cours de ces différents encadrements. J'ai su leur déléguer des expériences dont par la suite j'évaluais les résultats en leur présence. Lors des corrections de leur rapport, j'ai essayé d'apporter des connaissances rédactionnelles et méthodologiques.

➤ Compétence méthodologique

Au fur et à mesure de l'avancée de la thèse, j'ai pris de l'assurance et de l'autonomie en ce qui concerne l'expérimentation. J'ai ainsi développé un esprit d'analyse critique des résultats et pris des initiatives pour modifier et améliorer des protocoles communs au laboratoire. J'ai énormément appris par les échecs des expériences et j'ai pu parfois conseiller mes collègues lorsqu'ils avaient des soucis de manipulations.

De plus, j'ai eu l'occasion de gérer des stocks et notamment ceux des anticorps. Je centralisais toutes les commandes concernant les anticorps. Il a fallu au début se familiariser avec le vocabulaire concernant ce type de produit. Pour bien m'organiser, j'ai réalisé une liste d'anticorps disponible au laboratoire (nom de l'anticorps, fournisseur et référence, ...). J'ai rapidement eu des contacts avec différents fournisseurs ; j'ai ainsi appris la relation avec des commerciaux et à négocier des prix.

J'ai dû également contrôler le nombre de souris à l'animalerie. Cette zone est une plateforme utilisée par plusieurs laboratoires, il faut donc que chaque personne gère son stock d'animaux mais également respecte les bonnes pratiques d'expérimentation animale (ne pas surcharger les cages, ne pas faire souffrir l'animal, ...).

➤ Compétence de veille technologique et bibliographique

Au cours de la thèse, j'ai appris à effectuer une veille bibliographique. A partir de différentes bases de données sur internet, j'ai eu accès facilement à toutes les revues scientifiques concernant mon projet. Pour cela, j'ai su analyser les mots clés de mon projet à utiliser pour ces recherches. Régulièrement, je consulte les articles parus dans ces revues pour me tenir au courant des dernières découvertes.

➤ Compétences d'analyse et de synthèse

Au cours de la thèse, j'ai appris à analyser les résultats obtenus. En fonction de ceux-ci, je pouvais prévoir les expériences suivantes. Lors de différents séminaires, j'ai réalisé des posters sur lesquels je devais faire une synthèse de mon projet et des résultats obtenus. J'ai dû faire preuve de clarté et de mise en avant des résultats les plus pertinents. Il a fallu aussi que j'anticipe l'avenir en expliquant les perspectives et les expériences à venir.

➤ Compétence de communications

J'ai aussi développé des compétences de communication écrite. En effet, j'ai dû réaliser des demandes de financement pour ma thèse. J'ai ainsi appris à rédiger des projets de recherches, établir des calendriers prévisionnels en accord avec les projets. J'ai dû bien analyser les critères de sélection pour montrer que mon projet correspondait à l'appel d'offre. Il a fallu également que je m'applique dans la formulation des éléments à mettre en valeur. Pour cela, il a fallu que j'accentue le fait que mon projet avait un intérêt dans la compréhension de l'apparition de certains cancers.

J'ai aussi participé à la correction de rapports d'étudiants que j'ai encadrés et à la rédaction de publications en anglais.

J'ai également appris à parler en public, devant un groupe de personnes (réunions de laboratoire, séminaires). Il a fallu alors gérer le stress et apprendre à présenter les travaux de façon claire. Je me suis initiée à la vulgarisation de mon projet lors du séminaire de la pluridisciplinarité organisé par l'Ecole Doctorale en juin 2008 ainsi que lors de demandes de financement. Ce fut une expérience très enrichissante. Je suis très attachée à la vulgarisation car les chercheurs se cachent trop souvent derrière des mots très savants mais qui pour la plupart ne veulent rien dire. Il faut que les chercheurs s'ouvrent au monde extérieur et peut-être qu'en partie grâce à ces actions de vulgarisation, on arrivera à séduire les jeunes vers ce métier.

IV. RESULTATS ET IMPACT DE LA THESE

Le bilan de ces trois années de thèse est à la fois scientifique et personnel. D'une façon générale, il m'a permis de renforcer mes compétences techniques et ainsi d'acquérir une certaine autonomie dans la gestion d'un tel projet. Ce savoir-faire technique me donne la possibilité de mener un autre projet et je souhaiterais le réaliser en intégrant une nouvelle équipe de recherche. Ma volonté première est de continuer dans le domaine de la recherche

en effectuant un post-doctorat dans un autre laboratoire afin d'échanger et d'apprendre de nouvelles techniques. Le fonctionnement d'un autre laboratoire me semble très intéressant à découvrir pour ma future intégration professionnelle. Ayant réalisé toutes mes études à Limoges, je pense qu'il est important que j'acquière une autre expérience dans un cadre différent et si possible à l'étranger afin de découvrir un autre mode de fonctionnement et une culture différente. A l'issue de ce post-doctorat, je tenterai les différents concours (Maître de Conférence, Chargé de Recherche, Ingénieur), mon objectif premier étant de rester dans la recherche publique. Je n'exclus pas de chercher du travail dans le secteur privé. J'ai eu l'occasion de découvrir un peu le monde de l'entreprise pendant ma thèse grâce au développement d'une start-up dans le laboratoire (B-Cell Design). J'ai pu observer ce qu'est la recherche privée ainsi que les enjeux. Je pense que les compétences que j'ai acquises pendant la thèse sont compatibles avec le privé. Je pense que je rechercherai du travail dans des entreprises qu'après un post-doctorat pour augmenter mon niveau d'expérience (B-Cell Design, Oncomedics, Cayla,...).

D'ici un an, ma stratégie de recherche d'emploi se dirigera vers deux directions dont le cœur est la recherche, publique ou privée.

Toutefois, je suis consciente des difficultés et n'écarte pas la possibilité d'intégrer d'autres secteurs d'activités (hors champ de la recherche) où mes compétences scientifiques et personnelles acquises ces dernières années me permettront de m'intégrer et où je ferai certainement preuve d'autant d'enthousiasme.

RESUME

Le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit de nombreux remaniements géniques au cours de la maturation B (recombinaisons VDJ, recombinaison isotypique ou « switch », hypermutation somatique). Ils sont orchestrés par différents éléments *cis*-régulateurs. Ceux, situés en 3' des gènes constants, constituent la région 3'RR. Elle est composée de quatre activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1-2, hs3b et hs4) répartis sur 30 kb. La première partie de mon travail a consisté en l'étude du rôle de la région 3'RR dans la lymphopoïèse B par une approche « Knock-Out » (KO) de l'élément hs4 et de la totalité de la région 3'RR. Nous avons confirmé l'existence d'une redondance dans l'activité des éléments de cette région et son importance cruciale dans les processus de « switch » et de synthèse d'Ig. En parallèle, nous avons étudié sa contribution dans la lymphomagenèse B ; les recombinaisons géniques constituant une zone critique pour des événements de translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation d'oncogènes, tels que *c-myc* au cours du lymphome de Burkitt (LB). La région 3'RR seule est capable d'induire la surexpression de *c-myc* dans les souris *c-myc*-3'RR et de mimer l'apparition de tumeurs de type Burkitt *in vivo* possédant de nombreuses caractéristiques du LB humain comme les hypermutations en 5' et 3' des promoteurs du *c-myc* transgénique.

SUMMARY

The immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes many genetics recombinations during B cell maturation (VDJ recombination, class switch recombination and somatic hypermutation). These different events are regulated by several *cis*-regulatory elements. Those, presents at the 3' of constant genes, define the 3' regulatory region (3'RR). It is composed of four transcriptionnal activators named hs3a, hs1,2, hs3b and hs4, lying on a 30 kb-long DNA fragment. Firstly, I have investigated the *in vivo* role of the 3'RR in B cell development by creating Knock-Out (KO) models of the hs4 element and of the entire 3'RR. Results confirm the redundancy in the activity of the 3'RR elements and we show that the whole 3'RR is of dramatic importance for the class switch recombination process and Ig synthesis. We have also investigate the role of the 3'RR in B cell lymphomagenesis ; all the genetics recombinations being critical for chromosomal translocation events which cause oncogene deregulation, like *c-myc* in Burkitt lymphoma (BL). The 3'RR can induce *c-myc* surexpression in *c-myc*-3'RR mice and mimic the emergence of Burkitt tumors *in vivo* with the same characteristics of human BL including the occurence of numerous somatic mutations lying 5' and 3' of the transgenic promoters P1/P2.